

THIAGO ALVES DA COSTA

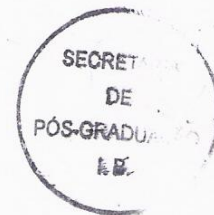
**Pb x LASERTERAPIA:
MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DE
LESÕES CUTÂNEAS**

Campinas

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



THIAGO ALVES DA COSTA

Pb x LASERTERAPIA:

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DE
LESÕES CUTÂNEAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
THIAGO ALVES DA COSTA
Verinaud
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular, na
área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra Liana Maria Cardoso Verinaud

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

AL87p Alves da Costa, Thiago, 1986-
Pb x laserterapia: mecanismos envolvidos na
cicatrização de lesões cutâneas / Thiago Alves da Costa.
– Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Liana Maria Cardoso Verinaud.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Laserterapia de baixa potência. 2. Lasers - Uso
terapêutico. 3. Laser HeNe. 4.
Paracoccidioidomicose. 5. *Paracoccidioides
brasiliensis*. 6. Cicatrização. I. Verinaud, Liana Maria
Cardoso, 1959- II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Pb x phototherapy: wound healing mechanisms of cutaneous lesions

Palavras-chave em Inglês:

Low-level laser therapy

Lasers – Therapeutic use

HeNe laser

Paracoccidioidomycosis

Paracoccidioides brasiliensis

Wound healing

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Liana Maria Cardoso Verinaud [Orientador]

Eva Burger

Clarice Weis Arns

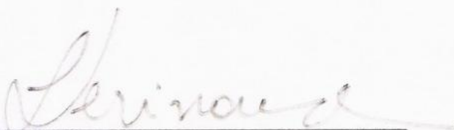
Data da defesa: 28-06-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 28 de junho de 2012.

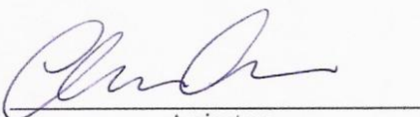
BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra Liana Maria Cardoso Verinaud (Orientadora)



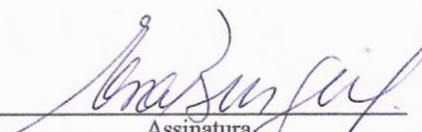
Assinatura

Profª. Dra. Clarice Weis Arns



Assinatura

Prof. Dra. Eva Burger



Assinatura

Dr. Alessandro dos Santos Farias

Assinatura

Dr. Ronei Luciano Mamoni

Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP (Processo # 10/08485-5)

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

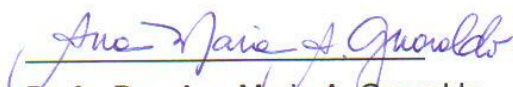
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1944-1**, sobre "**Prováveis mecanismos de ação envolvidos na cicatrização de lesões paracoccidiodomicóticas tratadas com laser de Hélio-Neônio**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Liana Verinaud / Thiago Alves da Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **31 de agosto de 2009**.

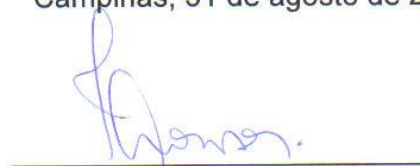
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1944-1**, entitled "**Possible action mechanisms of Helium-Neon laser therapy on experimental paracoccidiodomycotic wound healing**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 31, 2009**.

Campinas, 31 de agosto de 2009.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

Agradecimentos

A minha orientadora, Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud, parte fundamental da minha formação acadêmica, por toda a dedicação e comprometimento com meu desenvolvimento profissional.

Aos companheiros de laboratório presentes e passados, de forma geral por tornarem o dia a dia mais agradável, descontraindo quando necessário e apoiando sempre: Alliny Dionete por sua bondade e alegria, Rodolfo Thomé pelo auxílio e dicas na reta final e Lucimara Rocha pela ajuda técnica. Em especial à Carolina Francelin por sua disposição e grande ajuda em todas as etapas laboratoriais e à Rosária Di Gangi pela ajuda e empenho nos procedimentos necessários para realização desse trabalho.

Ao Marcos César, bioterista e grande amigo motivo de descontração e alegria fora do laboratório e também de seriedade e dedicação no auxílio à manutenção dos camundongos.

Aos colegas do departamento Júlia Ribeiro, Fernanda Barbieri, Luis Peroni, Adriel Santos Moraes, Fernando Pradella, Henrique Bianchi, Danilo Lopes, Georgia Porto.

À professora Dra. Leonilda M. B. Santos pelo uso do citômetro e ao Dr. Alessandro dos Santos Farias pelo auxílio na aquisição dos dados.

Aos biólogos do departamento Dirce Lima, José Raimundo e Rosemeire Florence de Paula pela prontidão em ajudar.

À Profa. Dra. Luciana Paulino pelo auxílio e disposição.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns e à Profa. Dagmar Stach-Machado pela participação na pré-banca desta dissertação.

À professora Dra. Maria Alice da Cruz Höfling pela colaboração na microscopia e à professora Dra. Elza Costa Cruz Vasconcellos pelo aparelho de *laser* HeNe.

À pesquisadora Dra. Maria Renata Sales Nogueira Costa pelo auxílio na análise histopatológica.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Histologia por todos os auxílios técnico e teórico.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por contribuir na manutenção da infra-estrutura para a realização do meu trabalho, e à secretária Lourdes, pelo esclarecimento de dúvidas e problemas ao longo do caminho.

À CAPES e ao CNPq, pelas bolsas de estudo de mestrado a mim concedidas, à FAEPEX pelo auxílio financeiro que possibilitou a apresentação de dados desse trabalho em um congresso e à FAPESP que financiou a execução desse trabalho.

A minha querida Marina, metade encontrada de mim, sua presença é, reconheço, a melhor recompensa que a vida me deu.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor e compreensão que me acompanha sempre, por me amparar e fornecer os valores pessoais sobre os quais trilhei meu caminho.

“Sabido é que todo o efeito tem sua causa, e esta é uma universal verdade, porém, não é possível evitar alguns erros de juízo, ou de simples identificação, pois acontece considerarmos que este efeito provém daquela causa, quando afinal ela foi outra, muito fora do alcance do entendimento que temos e da ciência que julgávamos ter.” (José Saramago)

Sumário

Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XV
Abstract.....	XVII
1. Introdução	
1.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e PCM	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1
Paracoccidioidomicose (PCM).....	3
Patogenicidade e virulência.....	4
Tratamento convencional.....	6
1.2 Cicatrização tecidual	
Quimiocinas.....	8
Fagócitos.....	9
1.3 Laserterapia de baixa potência	
Definição e Histórico.....	11
Atuação biológica da LLLT.....	14
Tratamento da PCM com laser HeNe.....	18
2. Objetivos.....	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Fungo.....	21
3.3 Preparo do Inóculo e infecção dos animais.....	22
3.4 Tratamento com o <i>laser</i> HeNe.....	22
3.5 Coleta e processamento do tecido para análise imunoistoquímica e histopatológica.....	23

3.6	Análise histopatológica.....	24
3.7	Análise imunoistoquímica.....	24
3.8	Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	25
3.9	Análise da produção de óxido nítrico (NO).....	26
3.10	Análise das populações celulares presentes na lesão PCM e no linfonodo poplíteo.....	26
3.11	Extração de RNA.....	28
3.12	Preparo de cDNA.....	28
3.13	PCR em tempo real.....	29
3.14	Análise estatística.....	29
4.	Resultados.....	30
4.1	Infecção dos animais.....	31
4.2	Análise histopatológica.....	31
4.3	Imunoistoquímica elastase e iNOS.....	35
4.4	Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	38
4.5	Produção de óxido nítrico (NO).....	38
4.6	Citometria de fluxo.....	39
4.6.1	Lesão PCM.....	39
4.6.2	Linfonodo poplíteo.....	40
4.7	Expressão gênica.....	45
4.7.1	Extração de RNA.....	45
4.7.2	Síntese do cDNA, quantificação, e padronização.....	45
4.7.3	PCR em tempo real.....	47
5.	Discussão.....	48
6.	Referências bibliográficas.....	58
7.	Anexos.....	75

Sumário

7.1 Artigo publicado.....	75
7.2 Artigo submetido.....	81

Abreviaturas

- AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- AMPc - Adenosina monofosfato cíclico
- AP-1 - Proteína de ativação 1
- ATF - Fator de ativação de transcrição
- ATP - Adenosina trifosfato
- BHI - do inglês, *brain heart infusion*
- CD - do inglês, *cluster of differentiation*
- cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
- CEEA - Comissão de ética na experimentação animal
- CEMIB - Centro multidisciplinar para investigação biológica
- CREB - AMPc-elemento de resposta de ligação
- DAB - Diamino-benzidina
- E₂ - 17-β-estradiol
- EDRF - Fator de relaxamento do endotélio
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- FGF - Fator de crescimento de fibroblasto
- gp43 - Glicoproteína de 43 quilodaltons
- HE - Hematoxilina-eosina
- HIF - Fator induzível de hipóxia
- IFN-γ - Interferon gama
- IgG2a - Imunoglobulina do tipo G2a
- IgG1 - Imunoglobulina do tipo G1
- IL - Interleucina

iNOS - NO-sintase induzida

KO - do inglês, *Knockout*

Laser HeNe - *Laser* de Hélio-Neônio

LED - diodos emissores de luz (do inglês, *light emitting diodes*)

LLLT - Laserterapia de baixa potência (do inglês, *low level laser therapy*)

LPS - Lipopolissacarídeo

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NETs - do inglês, *neutrophil extracellular traps*

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

NIR - próximo ao infravermelho (do inglês *near infrared*)

NK - do inglês, *natural killer*

NT1 - Animais não tratados após 8 dias de infecção

NT2 - Animais não tratados após 9 dias de infecção

NT3 - Animais não tratados após 10 dias de infecção

p53 - Proteína 53

Pb - *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb18 - Isolado altamente virulento do *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCM - Paracoccidioidomicose

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Ref-1 - Fator redox-1

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real

SBCAL - Sociedade brasileira para ciência de animais de laboratório

SFB - Soro fetal bovino

SOD - Superóxido dismutase

SPF - Livre de patógenos específicos

T1 - Animais tratados com uma sessão de irradiação com o *laser* HeNe

T2 - Animais tratados com duas sessões de irradiação com o *laser* HeNe

T3 - Animais tratados com três sessões de irradiação com o *laser* HeNe

Th1 - T auxiliar 1

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TNFR- α - Receptor do fator de necrose tumoral alfa

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

Resumo

Nosso grupo tem explorado os mecanismos biológicos que fundamentam o processo inflamatório das lesões paracoccidioidomicóticas cutâneas, causadas pela inoculação de leveduras no coxim plantar esquerdo de camundongos BALB/c, quando tratadas com *laser* HeNe. Neste trabalho, é mostrado que camundongos tratados com *laser* apresentaram redução do edema da pata, maior organização histológica, menor infiltrado inflamatório, maior organização do tecido de granulação ao redor da lesão, e imunomarcação maior da iNOS. A imunomarcação da elastase não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Além disso, a atividade da SOD e a produção de NO foram aumentadas. A expressão gênica das quimiocinas inflamatórias CCL3 e CXCL10 é menor nos animais tratados com 3 sessões de irradiação, enquanto que a expressão de CCL5 não apresentou diferenças significativas. A citometria de fluxo revelou uma maior porcentagem de macrófagos, em detrimento de menores números de neutrófilos, ao longo do tratamento. A porcentagem de células NK e NKT ligeiramente mais elevada após a sessão primeiro *laser*. No linfonodo poplíteo esquerdo, após uma sessão de tratamento com o *laser*, a porcentagem de macrófagos e neutrófilos é maior nos animais tratados, após 3 sessões de tratamento a porcentagem dessas células é igual nos 2 grupos experimentais, no entanto, a porcentagem de células dendríticas maduras é maior nos animais tratados. A quantidade de linfócitos T CD4⁺ é maior no linfonodo dos animais tratados com 2 sessões de irradiação, enquanto que a quantidade de T CD8⁺ é menor. No seu conjunto estes resultados apontam para um duplo efeito do tratamento, diminuindo a

resposta inflamatória e acelerando a cicatrização das lesões. Neste sentido, o *laser* de HeNe pode ser considerado como uma nova estratégia de terapia a ser utilizada como uma ferramenta adjuvante aos agentes anti-fúngicos para melhorar o tratamento de lesões de paracoccidioidomicóticas (PCM).

Abstract

Our group has been exploring the biological mechanisms underlying the inflammatory process of paracoccidioidomycotic lesions treated by HeNe *laser* on cutaneous lesions caused by the inoculation of yeast cells into the back foot-pad of Balb/c mice. In this work we showed that *laser*-treated mice presented reduction of footpad edema, greater histologic organization, milder inflammatory infiltrate, higher organization of the granulation tissue around the lesion, and enhanced immunolabeling of iNOS. The immunolabeling of elastase showed no significant alterations. In addition the SOD activity and NO production were increased. Chemokines CCL3 and CXCL10 showed decreased levels in animals treated with 3 *laser* sessions, but no significant difference was observed in relation to CCL5 expression. Also, a higher percentage of macrophages, in detriment of lower neutrophil numbers, were observed throughout the treatment. The percentage of NK and NKT cells were slightly higher after the first *laser* session. At the popliteal lymph node after one *laser* session the percentage of macrophages and neutrophils population were increased, after three *laser* sessions those percentages were similar with the non-treated group, however the mature dendritic cell population percentage was higher on the treated animals. CD4⁺ T Lymphocytes percentage was higher in animals treated with two *laser* sessions while CD8⁺ percentage was lower. Altogether these results point towards a dual effect of the treatment, decreasing the inflammatory response and accelerating the healing of the lesions. We believe that HeNe *laser* is a new non-harmful strategy that may be used as

an adjuvant tool to be combined with anti-fungal agents for improving the treatment of PCM lesions.

1. Introdução

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis* e PCM (paracoccidioidomicose)

Paracoccidioides brasiliensis

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica mais frequente na América do Sul e Central, antes denominada blastomicose sul-americana (Lacaz *et al.* 2002, Restrepo 1985). O Pb é um fungo termodimórfico, que em tecidos e culturas à 37°C, se apresenta sob a forma de levedura unicelular, enquanto que em temperaturas mais baixas (25°C) cresce na forma de micélio filamentosos (Lacaz *et al.* 2002, Restrepo *et al.* 2008, San-Blas *et al.* 2002).

O nome *Paracoccidioides brasiliensis* foi oficializado por Floriano Paulo de Almeida em 1929 (Almeida *et al.* 1929). A taxonomia inicialmente proposta por Ajello em 1977 para o Pb classificava-o da seguinte maneira: Reino *Fungi*, Filo *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hyphomycetes*, Ordem *Moniales*, Família *Moniliaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis*. No entanto estudos filogenéticos utilizando ferramentas moleculares propuseram outra classificação, agrupando o Pb com os demais fungos dimórficos (*Coccidioides posadasii*, *C. immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*) como pertencentes à seguinte categoria taxonômica: Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis*,

sendo denominado, então, de *Paracoccidioides brasiliensis* (Bialek *et al.* 2000, San-Blas *et al.* 2002).

O nicho ecológico do fungo *P. brasiliensis* ainda não foi determinado (Restrepo *et al.* 2001). Acredita-se que o habitat natural do patógeno seja o solo ou as plantas das áreas em que a PCM é endêmica, onde vive como saprófita (Ferreira *et al.* 2006, Restrepo *et al.* 2008). A PCM é limitada geograficamente à América latina e América Central devido à sua relação direta com o clima, a maioria dos casos acontece em áreas tropicais ou subtropicais onde a temperatura varia de 17° - 24°C e a precipitação anual é de 500 a 2500mm (Restrepo-Moreno, 1994, Marques 1998, Rivitti *et al.* 1999). Em 1972 Borelli criou o termo “reservarea” para indicar o habitat natural do *P. brasiliensis*, ou seja, o local onde o indivíduo pode infectar-se com o fungo. Esses locais ficam, frequentemente, em lugares elevados, próximos a rios e a outros cursos de água. No Brasil foram identificadas 14 “reservareas” pelo diagnóstico da PCM em residentes locais, as quais estão localizadas próximas a rios, em áreas com vegetação e colinas com altitudes entre 52 e 950 metros acima do nível do mar (Wanke e Londero, 1994).

Esse tipo de micose afeta principalmente homens na faixa etária de 30-60 anos que trabalham na agricultura, raramente é observada em crianças e jovens, quando não é tratada é quase sempre fatal (Brummer *et al.* 1993). As mulheres estão mais protegidas da doença, através da produção de estrógeno que atua em proteínas ligantes no citosol dos fungos, impedindo sua transformação de micélio em levedura (Stover *et al.* 1986). Outros estudos mostraram que o hormônio feminino 17-β-estradiol (E₂), em condições fisiológicas, levava a inibição do crescimento das células

leveduriformes (Muchmore *et al.* 1974). Clemons e colaboradores (1989) mostraram que o tratamento de culturas de Pb com E₂ modificava a expressão de proteínas durante a fase de transição micélio-levedura (Clemons *et al.* 1989). Assim o E₂ através desses mecanismos pode interferir na patogenicidade do *P. brasiliensis*.

Paracoccidioidomicose (PCM)

Os conídios produzidos pelos micélios saprófitas no meio ambiente são os responsáveis pela propagação da doença, cuja principal via de entrada é a aérea, onde a partir da chegada aos pulmões, os propágulos inalados se transformam em leveduras e estabelecem uma infecção primária (Brummer *et al.* 1993, Franco *et al.* 1989, McEwen *et al.* 1987). A PCM inicia como uma pneumonia assintomática, podendo se disseminar para outros órgãos por meio da corrente sanguínea e ou vasos linfáticos, como o fígado, o baço, as glândulas adrenais, a pele e a mucosa, entre outros, formando lesões graves, que permanecem viáveis até mesmo após o tratamento com antifúngicos (Borges-Walmsley *et al.* 2002, Brummer *et al.* 1993, Londero *et al.* 1972, Restrepo *et al.* 1970, 1973, 2000, Severo *et al.* 1979). O estabelecimento e a disseminação da PCM dependem tanto de fatores ligados ao fungo, como a virulência e composição antigênica, quanto de fatores ligados à resposta imune do hospedeiro. Assim, em formas graves da doença observada em pacientes, ocorre a perda progressiva da resposta imune celular específica, que é acompanhada por altos títulos de anticorpos, enquanto nas formas mais brandas da doença o que se observa é uma resposta celular bem preservada e baixos níveis de anticorpos específicos (Franco *et al.*, 1989, Franco & Montenegro, 1982).

As lesões provocadas na pele são muito dolorosas com aspecto de um pequeno edema avermelhado que progride até a formação de lesões ulcerativas, que freqüentemente resultam em uma infecção bacteriana secundária (Del Negro *et al.* 1982, Lupi *et al.* 2005, Trent *et al.* 2003). Histologicamente observam-se granulomas frouxos, bastante neutrofílicos e com muitos fungos, que mesmo após a cicatrização da lesão podem permanecer viáveis e, portanto, constituir novo foco da doença e/ou inflamação local crônica (Del Negro *et al.* 1982).

A utilização de animais como modelos experimentais para o estudo da PCM tem sido relatada por diversos autores. As linhagens de camundongos foram classificadas dentro de quatro grupos relacionados à susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*: grupo muito resistente (DBA/2, A/J e A/Sn); grupo resistente (C3H/He); grupo intermediário (C3H, HeB, CBA, C57Bl/10 e BALB/c) e grupo muito sensível (B10.D2/nSn, B10.A e B10.D2/oSn) (Calich *et al.*, 1985, 1994). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que as fêmeas de camundongos BALB/c e B10D2/nSn foram, significativamente, mais resistentes que os machos (Calich *et al.* 1985). Tais estudos foram baseados no tempo de sobrevivência dos camundongos infectados por via intraperitoneal com Pb18, isolado virulento de *P. brasiliensis*.

Patogenicidade e virulência

Os fatores de virulência permitem que os fungos patogênicos se desenvolvam frente os mecanismos de defesa impostos pelo hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento da infecção.

A virulência do *P. brasiliensis* tem sido associada aos polissacarídeos α -(1,3) glucana e β -(1,3) glucana que estão relacionados ao dimorfismo e à virulência deste patógeno. Estudos com diferentes isolados de Pb mostram que, a α -(1,3) glucana, contida na parede da célula leveduriforme do fungo, protege o patógeno contra enzimas digestivas produzidas pelos leucócitos e macrófagos do hospedeiro (Moraes & Schaffer, 2002, San-Blas & San-Blas, 1977). O parasitismo do *P. brasiliensis* ocorre quando este se transforma em levedura no início do processo infeccioso, evadindo-se, assim, da ação de enzimas fagocíticas, as quais digerem somente a β -(1,3) glucana (San-Blas *et al.* 1982).

San-Blas *et al.* (1984) demonstraram alteração na síntese de α -(1,3) glucana, após as amostras passarem por repiques sucessivos (*in vitro*), levando a perda ou a atenuação da sua virulência. Neste mesmo estudo, foi verificado que a adição de soro fetal bovino à cultura leva a produção desse polissacarídeo e conseqüente reativação da virulência.

Trabalhos realizados com camundongos observaram que amostras pouco virulentas do *P. brasiliensis* apresentaram quantidades de α -(1,3) glucana semelhantes às de duas outras amostras virulentas, insinuando a existência de outros fatores envolvidos na patogenicidade do fungo (Zacharias *et al.*, 1986).

A manutenção de alguns isolados do *P. brasiliensis* em laboratório, na forma de levedura, acarreta na atenuação ou perda da virulência dessas amostras após sucessivos repiques *in vitro* realizados por um longo período (Brummer *et al.* 1990, Kashino *et al.* 1990). Tem-se observado que a virulência dessas amostras pode ser recuperada através da infecção de animais, e subseqüente recuperação dessas

células. As características fisiológicas e genéticas desse fenômeno ainda são desconhecidas (Marconi *et al.* 2006).

Dentre os fatores próprios do fungo capazes de aumentar sua patogenicidade, os mais freqüentes são os lípidos e os polissacarídeos e, mais recentemente, a glicoproteína de 43 kDa (gp43), antígeno imunodominante de *P. brasiliensis* (Lopes *et al.* 1994, San-Blas *et al.* 1982, Vicentini *et al.* 1994). A gp43 é conhecida por mediar a ligação do *P. brasiliensis* com a matriz extracelular do hospedeiro, mais especificamente à laminina. Essa ligação da gp43 à laminina aumenta significativamente a patogenicidade do fungo, e pode constituir a base para o progresso da infecção, em direção à propagação regional e disseminação (Vicentini *et al.* 1994).

Acredita-se que a secreção espontânea da gp43 possa funcionar como um mecanismo de evasão da resposta imune pelo fungo, a gp43 livre se ligaria aos anticorpos do hospedeiro, deixando a gp43 presente na levedura, disponível para interagir com a laminina do hospedeiro e com isso aumentar a habilidade do fungo de evadir a resposta e disseminar para órgãos e tecidos distantes (Vicentini *et al.* 1994).

Tratamento convencional

Organismos pertencentes ao reino Fungi são muito semelhantes às células eucarióticas humanas, e dessa forma possuem muitas similaridades bioquímicas e fisiológicas, o que dificulta a utilização de recursos terapêuticos (Hamdan & Resende 1988).

O tratamento freqüentemente utilizado é longo, estendendo-se, normalmente, por meses, motivo pelo qual os pacientes comumente o abandonam, o que ocasiona muitas vezes a reincidência da doença (Brummer *et al.*, 1993, Mendes *et al.* 1994). O tratamento da PCM deve, obrigatoriamente, contemplar medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, além do tratamento antifúngico específico. Os pacientes devem ser acompanhados periodicamente, até que exibam os critérios de cura.

Diferentemente de outros fungos patogênicos, o *P. brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos. Dessa forma vários antifúngicos podem ser utilizados no tratamento dos pacientes, como a anfotericina B, os sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim) e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol), (Shikanai-Yasuda *et al.* 2006).

Entre os tratamentos mais eficazes está a administração de Itraconazol (um derivado do Imidazol). Dados obtidos de estudos no tratamento com itraconazol de 300 pacientes, mostram que a droga é eficiente em doses de 100 a 400 mg/dia administradas por um período de 6 a 24 meses (Naranjo *et al.* 1990). Esta droga requer um pH estomacal ácido para sua absorção, contraindicando-se, portanto, o uso de beta-bloqueadores e antiácidos durante o tratamento. Além disso, não pode ser utilizada para tratar pacientes com AIDS ou leucemia e não é eficiente no tratamento do fungo presente nos olhos, meninges, boca ou pele (Andriole *et al.* 1999). Outra dificuldade quanto ao uso desse medicamento é o custo benefício, já que alguns órgãos de saúde pública no Brasil não fornecem financiamento adequado para o longo tratamento com azóis (Yasuda 2005).

inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α , IFN- γ), ou pelo estímulo por estruturas como o LPS de bactérias gram negativas (Colobran *et al.* 2007, Rossi & Zlotnik 2000). As quimiocinas constitutivas são expressas na ausência de infecção ou dano, controlando desde tráfego celular no embrião e no feto até a circulação de leucócitos homeostáticos para vigilância imune (Colobran *et al.* 2007).

Algumas destas quimiocinas, como CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES) e CCL2 (MCP-1) são potentes quimioatraentes de macrófagos, que possuem importante papel na cicatrização tecidual (DiPietro *et al.* 1998, Gillitzer & Goebeler 2001).

Fagócitos

Os macrófagos possuem um papel central na cicatrização de lesões e constituem a principal célula fagocítica no reparo tecidual, removendo além dos organismos patogênicos remanescentes, os fragmentos (debris) de tecidos, células e matriz (Leibovich *et al.* 1975, Martin 1997). Quando ativados, secretam uma grande quantidade de fatores de crescimento e citocinas no sítio da lesão, amplificando assim, os sinais iniciais liberados pela desgranulação de plaquetas e neutrófilos (Martin 1997). Alguns desses fatores de crescimento, como o FGF (do inglês, *Fibroblast growth factor*) e o VEGF (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*) estimulam a proliferação das células endoteliais, que provavelmente possuem atividade pró-angiogênica em situações de cicatrização tecidual (Martin 1997).

Macrófagos ativados por IFN- γ são capazes de destruir os conídios do *P. brasiliensis*, por mecanismos não oxidativos, através da produção de óxido nítrico pela

via da L-arginina, que atua impedindo a transformação do patógeno em levedura (Brummer *et al.* 1988, Gonzalez *et al.* 2000).

Animais deficientes em IFN- γ (IFN- γ KO) e do receptor de TNF- α (TNFR- α KO) não são capazes de controlar a disseminação do *P. brasiliensis* de forma adequada. A deficiência desses mediadores acarreta na diminuição da produção de NO, prejudicando, dessa forma, a organização dos granulomas. A ativação dos macrófagos também é prejudicada nesses animais, assim como a imunidade celular como um todo (Souto *et al.* 2000). A presença de IFN- γ é necessária para a síntese de TNF- α , pelos macrófagos, fundamental no acúmulo e posterior diferenciação dessas células em células epitelióides, que são responsáveis pela formação e organização dos granulomas, impedindo a disseminação do fungo.

A resposta imune efetiva frente a infecções por patógenos intracelulares depende da produção de citocinas Th1, como o IFN- γ e TNF- α . Em tais situações, o IFN- γ possui diversas funções, entre elas promove a fagocitose e eliminação do microrganismo e induz a síntese de IgG2a, que é um anticorpo opsonizante mais eficiente do que IgG1 (Souto *et al.*, 2000).

Em lesões paracoccidioidomicóticas também é freqüente a presença prolongada de neutrófilos nos granulomas formados em resposta ao fungo. Esta permanência por períodos longos ocorre devido à produção de IL-8 pelos próprios neutrófilos (Acorci *et al.* 2009). Entretanto, os neutrófilos são menos eficientes na eliminação do Pb quando comparados aos macrófagos, pois muitos deles são susceptíveis à infecção por esse fungo, devido a deficiências no processo de fagocitose do patógeno, cuja causa ainda não foi determinada (Dias *et al.* 2008). De fato, ainda não se sabe ao certo se a

manutenção desses neutrófilos nos granulomas representa um mecanismo de resistência do hospedeiro ao fungo, ou se é uma forma do patógeno se manter presente e viável intracelularmente nos neutrófilos (Acorci *et al.* 2009).

A proteção contra a PCM está intimamente relacionada a uma eficiente imunidade celular, controlando a infecção e diminuindo a carga fúngica nos granulomas (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1985)

1.3 Laserterapia de baixa potência LLLT (do inglês, Low Level Laser Therapy)

Definição e Histórico

Devido ao desconforto provocado pelas lesões e aos efeitos colaterais das drogas utilizadas, novas estratégias inócuas têm sido estudadas como adjuvantes, ou ainda como terapias alternativas, para a erradicação do patógeno e aceleração da cicatrização das lesões muco cutâneas. Nesse sentido, os *lasers* de baixa potência podem configurar-se como adjuvantes terapêuticos com propriedades microbidas e cicatrizantes, uma vez que têm se mostrado potentes aceleradores de processos de cicatrização no tratamento de lesões cutâneas, como as causadas pelo herpes (Jovanovic *et al.* 1998), e, experimentalmente, na cura de queimaduras. A terapia com *lasers* de baixa potência também pode ser aplicada para remodelação óssea pós-fratura, contribuindo para deposição de matriz óssea e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (Garavello *et al.* 2004).

O *laser* é um dispositivo que emite luz através de um processo de amplificação óptica baseado na emissão estimulada de fótons. O termo “laser” é na verdade um

acrônimo para amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (do inglês, *light amplification by stimulated emission of radiation*) (Mcguff *et al* 1963). A luz *laser* emitida é notável pelo seu alto grau de coerência espacial e temporal.

Coerência espacial geralmente é expressa através da emissão de um feixe estreito cuja difração é limitada, sendo muitas vezes denominado “feixe lápis”. O *laser* pode ser lançado em um feixe de divergência muito baixa para concentrar sua energia a uma longa distância. Coerência temporal (ou longitudinal) implica uma onda polarizada com uma única frequência cuja fase é correlacionada sobre uma distância relativamente grande (o comprimento da coerência) ao longo do feixe. Os *lasers* são empregados em aplicações onde a coerência espacial e temporal requeridas na luz não podem ser produzidas usando tecnologias mais simples (Chung *et al* 2012).

A laserterapia de baixa potência (LLLT) surgiu em sua forma moderna logo após a invenção do *laser* de rubi em 1960, e do *laser* Hélio-Neônio (HeNe) em 1961. Em 1967, Endre Mester, trabalhando na Universidade Semmelweis em Budapeste, Hungria, percebeu que a aplicação de luz *laser* no dorso raspado de camundongos induzia o crescimento mais rápido dos pelos do que em camundongos não tratados (Mester *et al.* 1967). Mester também demonstrou que o *laser* HeNe era capaz de estimular a cicatrização de queimaduras em camundongos (Mester *et al.* 1971). Logo após ele aplicou seus conhecimentos em pacientes humanos, usando *lasers* para tratar úlceras de pele que não cicatrizavam (Mester *et al.* 1972, Mester *et al.* 1976). A LLLT já se tornou um procedimento terapêutico utilizado em três formas principais: para reduzir inflamação, edema e disfunções crônicas de articulações (Bjordal *et al.* 2003, Christie *et al.* 2007, Jamtvedt *et al.* 2008); para promover a cicatrização de feridas, tecidos

profundos e nervos (Gigo-Benato *et al.* 2005, Posten *et al.* 2005); e para tratar distúrbios neurológicos e dor (Chow *et al.* 2009).

A LLLT envolve a exposição de células ou tecido a baixos níveis de luz vermelha ou próximo do infravermelho (NIR do inglês *near infrared*), e é referida como “baixa potência” devido à utilização da luz em densidades de energia consideradas baixas em comparação com outras formas de laserterapia que são usadas para a ablação, corte e coagulação de tecido induzida termicamente. A LLLT também é conhecida como terapia com “*laser* frio”, já que as densidades de potência usadas são menores que as necessárias para induzir aquecimento do tecido. Originalmente, acreditava-se, que a LLLT necessitava do uso de luz *laser* coerente, mas, recentemente, diodos emissores de luz (LEDs do inglês *light emitting diodes*) tem sido propostos como uma alternativa mais barata. Um grande debate continua sobre se as duas fontes de luz diferem em seus efeitos clínicos (Chung *et al.* 2012).

Embora a LLLT seja usada atualmente para tratar uma grande variedade de doenças, ela permanece controversa como uma terapia por 2 razões principais: primeiro, os mecanismos bioquímicos que fundamentam o seu uso são pouco compreendidos, e com isso sua utilização é em grande parte empírica. Em segundo lugar, um grande número de parâmetros tais como o comprimento de onda, fluência, densidade de potência, estrutura do pulso e tempo de aplicação da luz devem ser escolhidos para cada tratamento. Uma escolha de parâmetros que difira pouco da condição ótima pode resultar em eficácia reduzida do tratamento ou até mesmo um resultado terapêutico negativo. Como resultado, muitos dos trabalhos publicados sobre LLLT incluem resultados negativos simplesmente devido à escolha inadequada de

fonte de luz e dosagem. Esta escolha é particularmente importante já que existe uma dose ótima de luz para uma aplicação em particular e doses maiores ou menores que esse valor ótimo podem não ter nenhum efeito terapêutico. De fato a LLLT é caracterizada por uma resposta à dose bifásica: doses mais baixas de luz são na maioria das vezes mais vantajosas do que altas doses (Huang *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2002, Sommer *et al.* 2001, Sutherland *et al.* 2002).

Assim, a terapia de *laser* de baixa intensidade obtida com a irradiação do *laser* hélio-neônio (HeNe) representa uma ferramenta promissora, uma vez que seu efeito microbicida, suas propriedades de cicatrização e suas características não invasivas já são bem documentadas na literatura. (Jovanovic *et al.* 1998, Qadri *et al.* 2005, Yu *et al.* 2003).

Dados da literatura mostram que os *lasers* de baixa potência são fortes estimuladores da síntese de componentes da matriz extracelular como os vários tipos de colágeno e fibras elásticas (Karu *et al.* 1989, Pugliese *et al.* 2003). Estes elementos de matriz estão intimamente relacionados com a reparação e remodelação tecidual, e sua síntese inicia-se logo após a injúria, prolongando-se até o final do processo de cicatrização (Thomas *et al.* 1995).

Atuação biológica da LLLT

O mecanismo bioquímico preciso que fundamenta os efeitos terapêuticos da LLLT ainda não está bem estabelecido. A partir de observações, parece que a LLLT tem uma ampla gama de efeitos nos níveis molecular, celular e tissular. Além disso, seus modos específicos de ação podem variar entre diferentes aplicações. Dentro da

célula, existem fortes evidências sugerindo que a LLLT atua na mitocôndria (Greco *et al.* 1989) levando ao aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) (Karu *et al.* 1999), modulação de ROS e indução de fatores de transcrição (Chen *et al.* 2011). Diversos fatores de transcrição são regulados por alterações no estado redox da célula. Entre eles o fator redox-1 (Ref-1), proteína de ativação-1 (AP-1) (um heterodímero de c-fos e c-jun), fator nuclear kappa B (NF-κB), proteína 53 (p53), fator de ativação de transcrição/AMPC-elemento de resposta de ligação (ATF/ CREB), fator de hipóxia induzível (HIF)-1 e o fator semelhante a HIF (HIFlike) (Chen *et al.* 2011). Estes fatores de transcrição, então, levam a síntese de proteínas que desencadeiam efeitos mais adiante, como aumento da proliferação celular e da migração, modulação nos níveis de citocinas, fatores de crescimento de mediadores inflamatórios e aumento na oxigenação do tecido (Karu *et al.* 2005).

Células do sistema imune, em particular, parecem ser fortemente afetadas pela LLLT. Os mastócitos, que desempenham um papel crucial na migração de leucócitos, são de considerável importância na inflamação. Comprimentos de onda específicos são capazes de desencadear a desgranulação de mastócitos, o que resulta na liberação da citocina pró-inflamatória TNF-α por essas células (el Sayed *et al.* 1996, Walsh *et al.* 1991). Isto leva a um aumento na infiltração de leucócitos nos tecidos. A LLLT também aumenta a proliferação e a motilidade dos fibroblastos, acelera a maturação dessas células e aumenta a produção do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Hawkins *et al.* 2005, Medrado *et al.* 2003). Os linfócitos se tornam ativados e proliferam mais rapidamente, as células epiteliais ganham motilidade, permitindo que as feridas cicatrizem mais rapidamente. A habilidade dos macrófagos para agir como fagócitos é

1.2 Cicatrização tecidual

Quimiocinas

A cicatrização tecidual é um processo complexo, dependente de múltiplas interações moleculares entre células de vários tipos, incluindo ativação de plaquetas e indução da cascata de coagulação; seguidas pela secreção de quimiocinas e outros fatores solúveis, que são essenciais para o recrutamento de leucócitos e ativação de células residentes (Azouz et al. 2004). A presença de receptores de quimiocinas nas células residentes (ex: queratinócitos, células endoteliais) indica que as quimiocinas também contribuem para a reconstituição do epitélio, remodelação tecidual e angiogênese. As quimiocinas possuem uma posição exclusiva para integrar eventos inflamatórios e processos de reparo e são importantes moduladoras da cicatrização na pele (Gillitzer & Goebeler 2001).

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular com propriedade de regulação da migração celular tanto em condições fisiológicas como na inflamação. Os receptores de quimiocinas são moléculas que possuem cadeias polipeptídicas que atravessam a membrana sete vezes e são membros da família de receptores ligados à proteína G e são agrupados de acordo com o tipo de quimiocina à qual se ligam (Rossi & Zlotnik 2000). O local e as circunstâncias em que as quimiocinas são expressas possibilitam que essas sejam divididas em quimiocinas inflamatórias e quimiocinas constitutivas. As quimiocinas inflamatórias são usualmente induzidas por monócitos ou macrófagos, no epitélio ou no endotélio, ou por fibroblastos através de estímulos

também melhorada após aplicação da LLLT (Chung *et al.* 2012). No nível mais básico, a LLLT age induzindo uma reação fotoquímica na célula, um processo conhecido como bioestimulação ou fotobiomodulação. Quando um fóton de luz é absorvido por um cromóforo nas células tratadas, um elétron do cromóforo pode ser excitado e pular de uma órbita de baixa energia para uma órbita de alta energia (Karu *et al.* 1987, Sutherland *et al.* 2002). Esta energia armazenada pode então ser usada pelo sistema para executar várias tarefas celulares. Várias evidências apontam para um cromóforo dentro da mitocôndria sendo o alvo inicial da LLLT. A irradiação do tecido com a luz leva a um aumento nos produtos mitocondriais, tais como ATP, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), proteína, RNA (Passarella *et al.* 1984), assim como um aumento recíproco no consumo de oxigênio e vários experimentos *in vitro* confirmam que a respiração celular é aumentada quando a mitocôndria é exposta ao *laser* HeNe ou outras formas de iluminação (Chung *et al.* 2012, Passarella *et al.* 1984).

Apesar dos mecanismos da atuação biológica do *laser* ainda não serem completamente compreendidos, é sabido que, para interagir com a célula, a luz precisa ser absorvida por um cromóforo intracelular. Segundo hipótese formulada por Klebanov *et al.*, porfirinas endógenas seriam os primeiros aceptores da radiação do *laser*, que poderiam iniciar reações de radicais livres fotoinduzidas nas membranas celulares, responsáveis pelo aumento da permeabilidade dessas membranas à íons Ca^{2+} (Klebanov *et al.* 2003, Vladimirov *et al.* 2004). O aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} pode levar a síntese de NO-sintase induzida (iNOS) por macrófagos e mudanças na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente dos

radicais de superóxido (Klebanov *et al.* 2005). Além disso, sob a ação do *laser* HeNe, a superóxido dismutase (SOD), responsável por catalisar a reação que converte radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (que são bem menos reativos), é reativada (Vladimirov *et al.* 2004).

Durante um processo inflamatório, o consumo de oxigênio molecular no tecido afetado aumenta, e com isso a produção de radicais de superóxido também aumenta. No entanto, o pH durante um processo inflamatório é próximo de 5.9, e nesse pH a SOD está inativa. O mecanismo que foi proposto para esta reativação, seria que, a radiação do *laser* HeNe atuaria na desprotonação da histidina na SOD, restaurando deste modo, as pontes de zinco com o cobre (Vladimirov *et al.* 2004). Assim, a concentração de radicais superóxido diminui na região onde a SOD está ativa, minimizando os danos causados às células e ao tecido (Vladimirov *et al.* 2004). Uma maior atividade da SOD pode, também, promover relaxamento da parede dos vasos sanguíneos devido à diminuição da concentração de superóxido, que com isso contribui para manter alto o nível de fator de relaxamento do endotélio (EDRF), além disso, a atividade bactericida fagocítica aumenta devido à maior formação de peróxido de hidrogênio (Klebanov *et al.* 2005).

Vladimirov *et al.* postularam que, a ação do *laser* sobre as membranas celulares acompanhada por um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , somada à fotoreativação da SOD e também à fotólise dos complexos metálicos de NO (liberando esse vasodilatador), fundamenta a atividade bactericida, regenerativa e de vasodilatação indireta da ação do *laser* HeNe (Vladimirov *et al.* 2004).

Tratamento da PCM com *laser* HeNe

Nosso grupo de pesquisa vem investigando a ação do *laser* HeNe no tratamento de lesões cutâneas induzidas pela infecção paracoccidiodomicótica. Nossos resultados mostram que animais submetidos ao tratamento com o *laser* HeNe, apresentam redução do edema e aceleração no processo de cicatrização quando comparados aos animais não irradiados (Ferreira *et al.* 2006). A análise imunoistoquímica do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) revelou uma marcação de forma bem distribuída e espalhada nas lesões de animais irradiados com *laser*, aspecto compatível ao de lesões em fase final de cicatrização. Já a marcação para o Interferon-gama (IFN- γ) foi mais intensa nos tecidos dos animais não irradiados com *laser*, como é o caso de inflamações persistentes. Ainda, a epiderme adquiriu um aspecto histológico normal após o tratamento com o *laser*, enquanto os animais não tratados apresentaram um epitélio com caráter histológico desorganizado, com grandes falhas devido à supuração (Ferreira *et al.* 2009). Também foi observado que, em lesões de animais não tratados, o infiltrado neutrofílico era extenso, enquanto que nas lesões de animais tratados o infiltrado celular era composto em sua maioria por macrófagos (Ferreira *et al.* 2009). Isso nos leva a crer que possivelmente o *laser* modula a presença dos tipos celulares na lesão paracoccidiodomicótica.

Nossos resultados também mostram que a expressão gênica de algumas quimiocinas inflamatórias apresenta um padrão de queda nos animais tratados quando comparados aos animais não tratados, evidenciando uma cicatrização acelerada, muito provavelmente, induzida pela ação do *laser* (Nagib *et al.* 2010). Este padrão de expressão de quimiocinas observado nos animais tratados é característico do final de

um processo de inflamação, com queda na expressão das quimiocinas inflamatórias. Este fenômeno está provavelmente relacionado ao tempo de tratamento utilizado, já que os experimentos só foram realizados após o terceiro dia de tratamento consecutivo, quando a lesão já apresentava redução do edema e aparente cicatrização. Dados do nosso grupo oferecem suporte a esta hipótese, pois mostram que as lesões de animais tratados com o *laser* HeNe apresentaram, uma queda na expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias e um aumento na deposição de fibronectina e laminina (Nagib *et al.* 2010).

Assim, sabendo-se das propriedades microbidas e cicatrizantes do *laser* HeNe, do crescente interesse por este tipo de terapia devido às suas características pouco invasivas e dos resultados promissores obtidos recentemente em nosso laboratório, o presente projeto pretendeu, utilizando o mesmo modelo experimental de paracoccidioidomicose, analisar os mecanismos de modulação da resposta imune induzidos pelo *laser* HeNe. Através de uma melhor compreensão dos efeitos da *laser*terapia, a utilização deste tipo de tratamento, como adjuvante ao tratamento convencional com antifúngicos sistêmicos, é absolutamente viável, pois contribuirá de forma segura para a aceleração da cicatrização das lesões e diminuição do desconforto dos pacientes quanto ao aspecto das lesões.

2. Objetivos

Frente ao exposto na introdução, o presente trabalho teve como objetivo geral:

Analisar os efeitos microbicidas e cicatrizantes da terapia com o *laser* HeNe sobre a cicatrização de lesões paracoccidiodomicóticas.

Objetivos específicos:

- Efeitos cicatrizantes:
 - Análise da histopatologia das lesões paracoccidiodomicóticas, caracterizando as diferentes populações celulares;
 - Avaliação das populações celulares presentes na lesão e no linfonodo poplíteo através de citometria de fluxo;
 - Análise da expressão das quimiocinas CCL3, CCL5 e CXCL10 produzidas por fagócitos presentes nas lesões através de PCR em tempo real

- Efeitos microbicidas:
 - Análise da produção de Óxido Nítrico (NO) e da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD);
 - Avaliação da produção *in situ* de iNOS por macrófagos e da elastase por neutrófilos presentes nas lesões por técnica imunoistoquímica

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais:

Camundongos machos, da linhagem BALB/c, com 8 semanas de idade, foram obtidos do CEMIB-UNICAMP a partir de colônias SPF (do inglês, *Specific Pathogen Free*). Os animais foram mantidos, durante todo o período experimental, em micro isoladores acondicionados em *racks* ventiladas (ALESCO, Monte-Mor, São Paulo, Brasil) com água e ração estéreis, fornecidas *ad libitum*, e com um ciclo de fotoperíodo de 12h/12h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas propostas pela Sociedade Brasileira para Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (CEEA/Unicamp) com o protocolo nº1944-1.

3.2 Fungos:

Foi utilizado o isolado virulento de *P. brasiliensis*, denominado Pb18, gentilmente cedido pela Prof^a Dr^a Vera L. G. Calich do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). O isolado tem sido mantido, no laboratório, na fase leveduriforme em meio de cultivo Fava-Netto a 37°C, sendo repicado a cada 7 dias. Para manutenção da virulência da cepa, a cada seis meses os fungos são inoculados em animais susceptíveis, recuperados do fígado e baço e semeados em meio BHI (Brain Heart Infusion) suplementado.

3.3 Preparo do inóculo e infecção dos animais:

Para o preparo da suspensão fúngica, a cepa de *P. brasiliensis*, foi cultivada em meio de Fava Netto e coletada em sua fase de crescimento exponencial (após 7 dias de cultivo). As células fúngicas foram ressuspensas em 5mL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) estéril, pH 7.2, agitadas em agitador tipo Vortex, em três ciclos de 30 segundos cada, com intervalos de 60 segundos. O sobrenadante foi ressuspensado em 10mL de PBS estéril e posteriormente centrifugado a 280 x g, 4°C por 10 minutos. O número total de células fúngicas presentes na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão final ajustada para 1×10^8 fungos/mL. A viabilidade fúngica foi determinada pelo teste de exclusão do corante azul de Trypan (Phillips 1973). Os animais foram inoculados com 50µl da suspensão no coxim plantar da pata esquerda. O coxim plantar direito foi inoculado com igual volume de PBS estéril, servindo como controle.

3.4 Tratamento com o *laser* HeNe

Após sete dias da infecção com *P. brasiliensis* as lesões eram clinicamente homogêneas, o que permitiu que os animais fossem separados em seis grupos de cinco animais cada, sendo três grupos experimentais (T1, T2, T3) e três grupos controles (NT1, NT2, NT3). Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o tempo de tratamento que receberam, sendo estes: uma sessão de irradiação com *laser* HeNe (T1), duas sessões de irradiação (T2) e três sessões de irradiação (T3), o tratamento foi iniciado no sétimo dia após a infecção e o intervalo entre cada sessão de tratamento foi de 24 horas. Os grupos controles foram manipulados da mesma forma,

mas com o equipamento desligado. O *laser* utilizado no estudo foi um *laser* de Hélio-Neônio com potência média determinada em 3,5 mW, capaz de emitir um feixe colimado (diâmetro de 4 mm) com comprimento de onda em 632.8 nm. O fluxo de irradiação para cada tratamento (previamente determinado por estudos dose dependente) foi de 3.0 J/cm² com tempo de estímulo de 110 segundos. A sonda do *laser* foi aplicada de forma pontual sobre a lesão PCM sem anestesia ou sedação. Animais controle foram manipulados da mesma maneira que os animais experimentais com exceção da aplicação do *laser* nas lesões.

A formula utilizada para o cálculo do tratamento foi $D = P_m \times t/A$, onde D é a dose do tratamento, P_m é a potência média, t é o tempo de exposição e A é a área do feixe de luz. O sacrifício dos animais foi realizado 24 horas após o tratamento de cada grupo experimental e manipulação do grupo controle.

3.5 Coleta e processamento do tecido para análise imunoistoquímica e histopatológica

Os coxins plantares esquerdos dos animais tratados e não tratados de todos os grupos experimentais foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M por 16 horas a 4°C. Após a fixação os órgãos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70, 80, 85, 90, 95-100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os órgãos foram então submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos com 5µm de espessura.

3.6 Análise histopatológica

Os cortes histológicos obtidos no micrótomo foram desparafinizados com xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol (100-95, 90, 85, 80, 70%), e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise de possíveis alterações estruturais. As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de luz (Olympus, BX50).

3.7 Análise imunoistoquímica

Para realização da técnica de imunoistoquímica indireta utilizada para a análise da produção de iNOS e elastase por neutrófilos nas lesões tratadas e não tratadas, os cortes histológicos obtidos no micrótomo foram desparafinizados com xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol (100-95, 90, 85, 80, 70%) e lavados em PBS. Os cortes histológicos foram imersos em uma cubeta contendo o tampão Tris-EDTA [base Tris 10mM; 1mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) pH9.0], que foi colocada em uma panela de vapor já aquecida, para a recuperação antigênica do tecido. Em seguida, procedeu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos de reação com o soro bloqueio do kit de amplificação da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) e o bloqueio da peroxidase endógena utilizando H₂O₂ a 3% em metanol. Foram utilizados anticorpos primários específicos para iNOS e elastase (Abcam, Cambridge, UK), anticorpos secundários marcados com biotina e o kit de amplificação (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). A reação foi revelada utilizando-se H₂O₂ 0,03% como substrato da enzima e 3-3 Diamino-benzidina (DAB) 0,01% como cromógeno em PBS pH 7.4. Em seguida o material foi contracorado com Hematoxilina de Harris, desidratado e montado com Permount (Fischer Scientific, Nova Iorque, USA). O

controle negativo da reação foi feito com a ausência dos anticorpos primários. A análise quantitativa da expressão dessas moléculas foi realizada com o auxílio do software Image J (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). As imagens foram transformadas em preto e branco onde a marcação pelo DAB é convertida em preto e o tecido não marcado fica branco, utilizando o parâmetro densidade integrada de pixels (Collins 2007) obtemos um número utilizado nas análises estatística com o software GraphPad Prism 5.0.

3.8 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Os coxins plantares esquerdos, obtido dos animais tratados e não tratados com o *laser*, foram retirados e macerados em 1 mL de PBS 1x, a solução obtida foi filtrada com auxílio de uma seringa e um filtro 0.22 μm e posteriormente centrifugada a 1000g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para o ensaio com o kit colorimétrico SOD Assay Kit-WST (Sigma-Aldrich, USA). A reação para determinar a atividade da SOD utilizou a redução do WST-1 (sal tetrazólico altamente solúvel em água da Dojindo) por ânions superóxido, produzindo o corante formazam. A redução das moléculas de oxigênio em superóxido é linearmente dependente da atividade da xantina oxidase que é inibida pela atividade da SOD. A densidade óptica da amostra foi medida a $\lambda=450\text{nm}$ em um espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, CA, USA). A atividade da SOD dismutase foi calculada através da taxa de inibição da reação, a concentração de SOD nas amostras foi obtida a partir da curva de inibição com uma SOD comercial de concentração conhecida (Sigma S2515).

3.9 Análise da produção de óxido nítrico (NO)

Os coxins plantares esquerdos, obtido dos animais tratados e não tratados com o *laser*, foram retirados e macerados em 1 mL de PBS 1x, a solução obtida foi filtrada com auxílio de uma seringa e um filtro 0.22 μm e posteriormente centrifugada a 1000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para o ensaio com o kit colorimétrico Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA). Os produtos finais do NO *in vivo* são o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-), então para analisar a produção total de NO é preciso averiguar a quantidade dos seus metabólitos. A reação utilizada para medição da produção de NO é um processo de 2 passos. O primeiro passo é a conversão do nitrato em nitrito utilizando a nitrato redutase. O segundo passo é a adição dos reagentes de Griess que convertem o nitrito em um composto azóico de cor roxa escuro. A densidade óptica da amostra foi medida a $\lambda=540\text{nm}$ em um espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, CA, USA). A concentração de NO nas amostras foi obtida a partir da curva padrão com concentrações conhecidas de nitrato.

3.10 Análise das populações celulares presentes na lesão paracoccidioidomicótica e no linfonodo poplíteo esquerdo

Após o sacrifício dos animais, os coxins plantares e os linfonodos poplíteos esquerdos, obtidos dos animais tratados e não tratados com o *laser*, foram retirados, separados de acordo com o seu grupo experimental e macerados em 10 mL de PBS-Soro Fetal bovino (SFB) 10% com o auxílio de peneiras e êmbolos estéreis, de forma a se obter um *pool* celular proveniente de 5 animais do mesmo grupo. A suspensão

celular obtida passou por um cell strainer com poros de 100µm (BD, San Diego, CA, USA) sendo depois centrifugada por 10 minutos a 300g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células resultante foi ressuspensão em PBS-SFB 10%. Em seguida procedeu-se à lise das hemácias através do uso de solução de lise de hemácias [(ACK) cloreto de amônio 0.16M NH₃Cl; bicarbonato de potássio 0,01M KHCO₃;1mM EDTA, pH 7.4].

O número de células presentes na suspensão foi contado em câmara de hemocitométrica e a concentração ajustada para 10⁶ células/mL. A análise fenotípica da citometria de fluxo multi-cor foi realizada no citômetro Gallios (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) usando isotiocianato fluorescente (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), PE-cianina 5 (PE-Cy5), APC-cianina 7 (APC-Cy7) como fluorocromos. Foram usados anticorpos anti-camundongos obtidos em ratos, a técnica empregada foi de fluorescência direta: CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, Ly6G/6C (BD Pharmigen, San Jose, CA), CD11b, CD11c, MHC II, NK1.1 (eBioscience, San Diego, CA, USA). Para a detecção dos macrófagos foi utilizado o anti-camundongo para a molécula semelhante ao receptor F4/80 (F4/80-like receptor) com bloqueio da porção Fc de camundongo da BD™ através do anticorpo monoclonal purificado anti-camundongo CD16/CD32 2.4G2, a marcação foi amplificada usando um anticorpo monoclonal anti-rato IgG2a RG7/1.30 biotilado seguido por um terceiro passo com estreptavidina-APC (BD Pharmigen, San Jose, CA, USA). As células foram incubadas com esses anticorpos por 20 minutos a 4° C. Em seguida as células foram lavadas com PBS, centrifugadas por 5 minutos a 300g e logo após fixadas com formaldeído 1% e submetidas à leitura no citometro de fluxo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A

análise dos dados foi feita após adquirir 10.000 eventos para cada amostra, utilizando o software FlowJo 7.6.5 (Ashland, OR, USA).

3.11. Extração de RNA

Após o sacrifício dos animais, os coxins plantares esquerdos foram retirados e submetidos à extração de RNA total através do Kit Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Amersham, UK). Os coxins foram macerados em tampão de lise contendo β -mercaptoetanol e em seguida foi adicionado etanol 70%. A solução foi centrifugada em diferentes colunas para adsorção do RNA. Para eliminar a presença de DNA as amostras foram tratadas com DNase por 15 minutos em temperatura ambiente.

Após a extração, o RNA foi eluído da coluna com 50ul de água ultra-pura e as amostras congelados a -70° C. O RNA foi submetido à corrida em gel de agarose desnaturante para verificação de integridade (presença das bandas de RNA 18S e 28S) e foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para avaliar a concentração de RNA nas amostras, as razões 260/280 (onde a pureza do RNA da amostra é estimada) e 260/230 (usado para determinar se ocorreu contaminação da amostra com componentes fenólicos e ou carboidratos).

3.12 Preparo de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados aproximadamente 2ug de cada amostra de RNA para a síntese de cDNA.

3.13 PCR em tempo real

A expressão dos genes das quimiocinas foi avaliada através PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para cada gene analisado, foi montada uma placa de 96 orifícios compreendendo todos os grupos experimentais em uma única reação. As reações foram preparadas com o kit comercial TaqMan PCR Master Mix™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e realizadas no aparelho ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Diferentes oligonucleotídeos e sondas foram utilizadas nos ensaios para a amplificação do controle endógeno, RNA 18S (Hs99999901_s1), e dos alvos, a saber: CCL3 (Mm00441259_g1), CCL5 (Mm01302427_m1) e CXCL10 (Mm99999072_m1). A expressão gênica das quimiocinas nos grupos controles e tratados foi representada como o número relativo de cópias usando o método do ciclo delta threshold $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct$ do gene alvo menos Ct do RNA 18S) (Overbergh *et al.* 2003).

3.14 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados e a confecção dos gráficos foram obtidas através do software GraphPad Prism 5,0. As amostras foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann Whitney, os resultados são dados em forma de valores médios (\pm desvio padrão), sendo consideradas estatisticamente diferentes quando o valor de p era menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. Resultados

4.1 Infecção dos animais

As lesões PCM nos coxins plantares dos animais foram avaliadas diariamente tanto nos animais tratados com o *laser* quanto nos não tratados. A análise macroscópica mostrou que os animais tratados com o *laser* apresentam uma rápida redução da lesão, com boa cicatrização, quando comparados aos animais não tratados. No início do tratamento, ou seja, 7 dias após o início da infecção, as patas apresentavam uma lesão extensa. Macroscopicamente, as lesões apresentaram aspecto edematoso no início, mas após 3 sessões com o *laser*, evoluíram para pequenos nódulos (Figura 1).

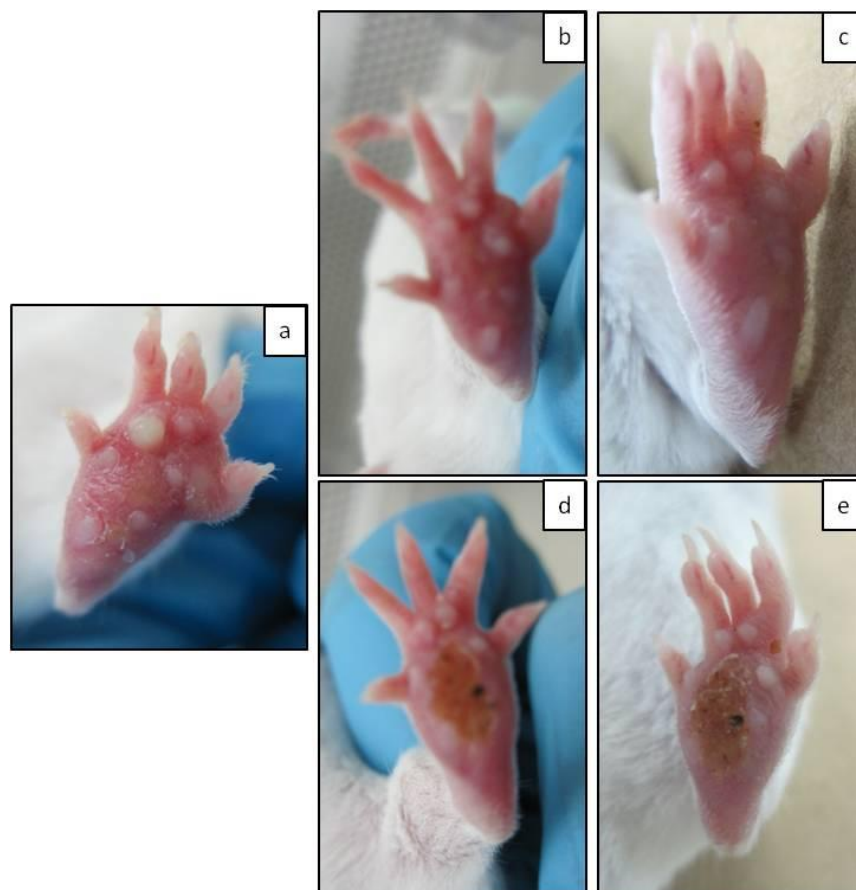


Figura 1: Fotografia representativa de lesão na pata de animais infectados com *P. brasiliensis* e que receberam, ou não, tratamento com *laser* HeNe. (a) Pata de animal com sete dias de infecção imediatamente antes do tratamento. Notar o aspecto edemaciado e a extensa área da lesão. (b) e (c) Pata de animal tratado com duas e três sessões de *laser* (9 e 10 dias de infecção), respectivamente. Notar a regressão das feridas, aspecto melhor da lesão e redução do edema. (d) e (e) Pata de animal não tratado após 9 e 10 dias de infecção respectivamente. Notar aumento de edema em relação aos animais tratados bem como aumento da área de lesão.

4.2 Análise histopatológica

A análise histopatológica dos cortes obtidos de animais não tratados e tratados com o laser revelou diferenças na cicatrização da lesão PCM e na reorganização do tecido a sua volta. As lesões PCM experimentalmente induzidas no coxim plantar possuem um padrão tecidual e celular muito particular que pode ser melhor compreendido com o auxílio do esquema na figura 2.

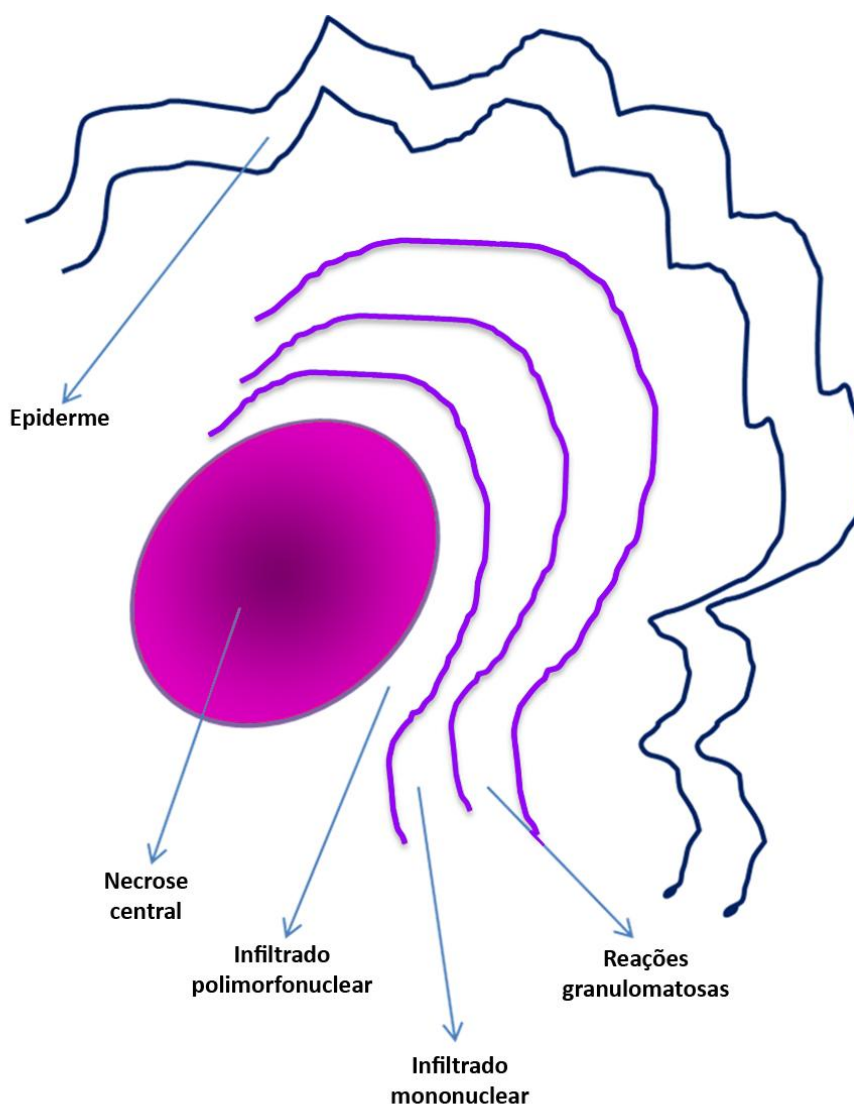


Figura 2: Esquema da organização histológica e celular da lesão paracoccidioidomicótica no coxim plantar. Área de necrose central → local do inóculo das leveduras do Pb18

As lesões paracoccidioidomicóticas obtidas dos animais não tratados (NT) tinham o mesmo padrão nos 8, 9 e 10 dias após a infecção, onde é possível observar uma epiderme e derme superficial histologicamente desorganizadas, com um intenso infiltrado inflamatório misto onde alguns fungos podem ser vistos (Figura 3A). No centro da lesão uma grande área de necrose com exsudato fibrinoso, restos celulares e

células fúngicas viáveis pode ser vista (Figura 3B). Os cortes histológicos de animais tratados com uma sessão de irradiação com *laser* (T1) apresentaram o mesmo padrão morfológico observado nas amostras não tratadas, mas com hialinização das fibras colágenas no tecido conjuntivo e escassez de macrófagos vacuolizados em detrimento de maior área de reação granulomatosa.

Em camundongos tratados com duas sessões de irradiação com *laser* (T2) a epiderme e a derme superficial apresentaram uma maior organização histológica, infiltrado mononuclear moderado e um leve aumento na deposição de colágeno (Figura 3C). No centro da lesão ainda existe uma área de necrose substancial, mas o infiltrado inflamatório é misto e menos fungos viáveis estão presentes (Figura 3D).

Após 3 sessões de irradiação com o *laser* (T3), a derme apresentou uma aparência histológica normal com uma intensa deposição de colágeno (Figura 3E). Neste momento, as lesões também apresentaram uma maior organização do tecido de granulação tendendo para o encapsulamento da lesão (Figura 3F).

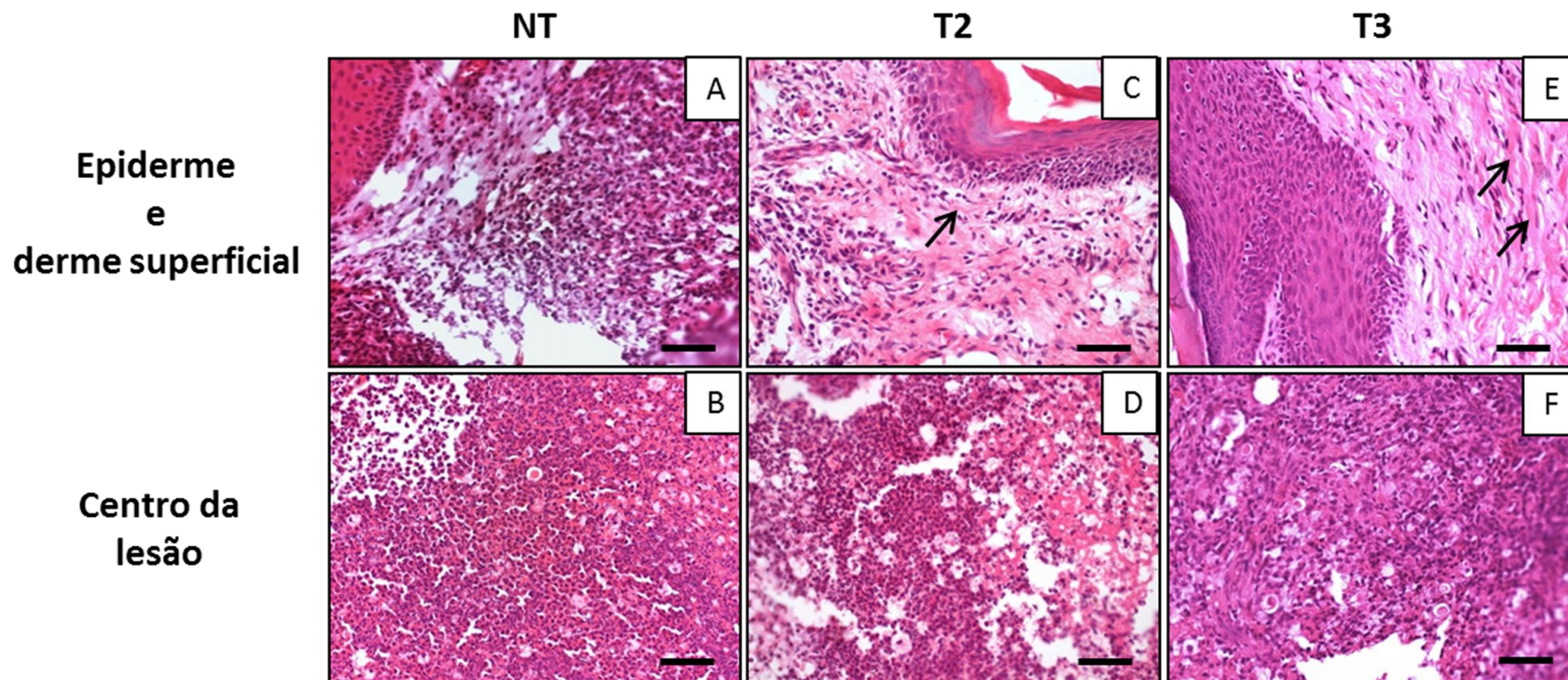


Figura 3: Características histopatológicas representativas de lesões PCM. A e B: animais não tratados com o *laser*; C e D: animais tratados com 2 sessões de *laser* (T2); E e F: animais tratados com 3 sessões de *laser* (T3). Nos animais NT observar o aspecto desorganizado da epiderme e da derme superficial, com um intenso infiltrado inflamatório misto (A), no centro da lesão, há uma área necrótica rodeada por um infiltrado de polimorfonucleares (PMN) onde várias células de levedura podem ser vistas (B). As lesões em T2 apresentam um infiltrado mononuclear mais brando e um leve aumento na deposição de colágeno (seta) em (C), em (D) uma área necrótica rodeada com um infiltrado PMN está presente, mas menos células de levedura são vistas. As lesões em T3 apresentam uma aparência histológica normal e um aumento na deposição de colágeno (seta) em (E), em (F) pode-se observar reações granulomatosas, um infiltrado inflamatório misto e menos células de levedura presentes. Barra de escala: 50µm. Aumento 400x. Coloração: H&E.

4.3 Imunoistoquímica elastase e iNOS

A análise da produção de elastase revelou uma alta expressão tanto nos animais que tiveram sua lesões tratadas com *laser* HeNe quanto nos seus respectivos controles, no entanto na análise quantitativa executada no software Image J (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Figura 4).

A análise da produção de iNOS, pela técnica de imunoistoquímica indireta, mostrou uma expressão aumentada dessa molécula nos animais tratados com o *laser* HeNe quando comparados aos animais não tratados (Figuras 5A a 5D). Enquanto os animais não tratados apresentaram uma fraca marcação para iNOS (Figura 5A) os animais tratados exibiram uma forte marcação para essa molécula (Figuras 5B, 5C e 5D). A análise quantitativa dessas imagens mostrou que além da diferença entre os animais tratados e não tratados, existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais tratados, mostrando um aumento gradual da expressão dessa molécula conforme aumentam as sessões de irradiação com o *laser* HeNe (Figura 5E).

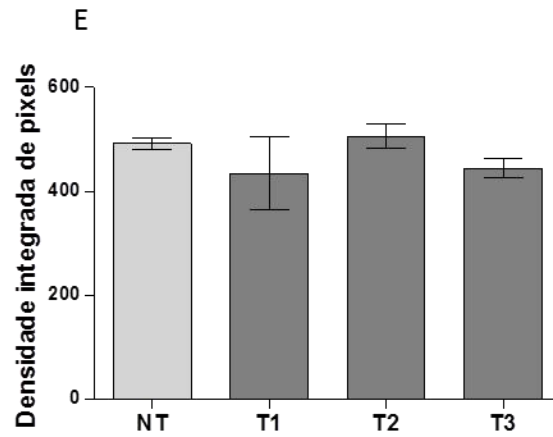
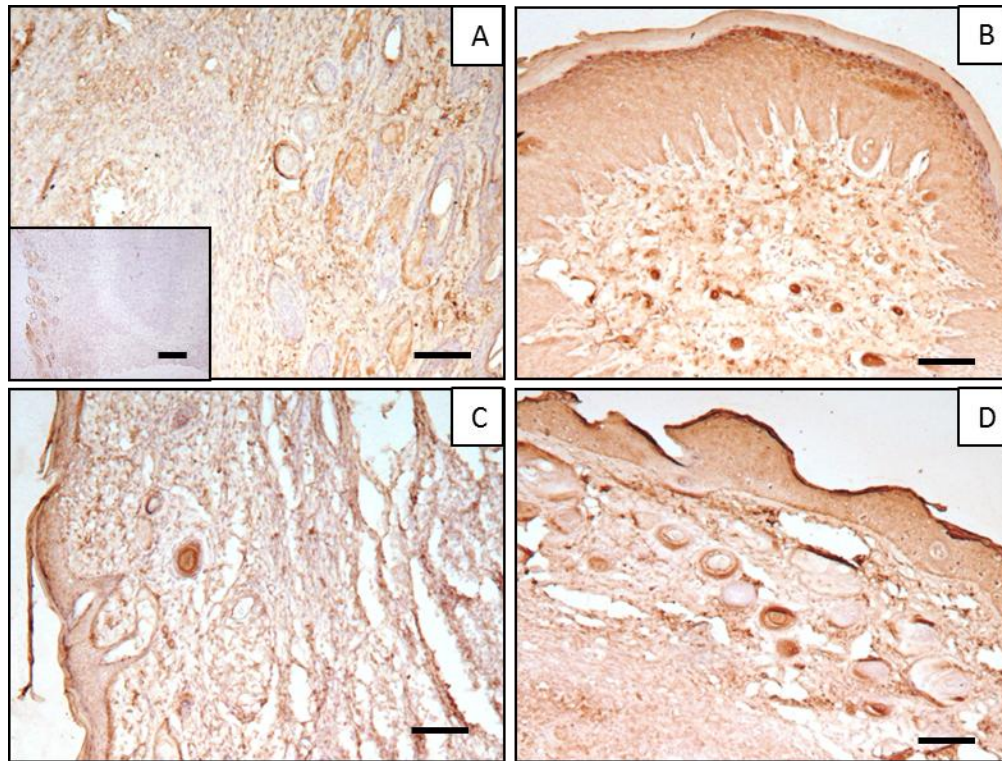


Figura 4: Marcação imunoistoquímica representativa para elastase. A: animais não tratados (NT); B a D: Animais tratados com uma, duas e três sessões de irradiação com *laser* (T1, T2 e T3, respectivamente). Inseto: marcação controle, incubação com soro não imune. Barra de escala: 250 μ m. E: Os gráficos correspondem à análise quantitativa de campos microscópicos selecionados de lesões a partir de lesões tratadas e não tratadas, em termos de elastase. Os resultados são expressos em pixels totais e representam a média \pm desvio padrão de, pelo menos, cinco animais. Barra de escala: 100 μ m. Aumento 100x.

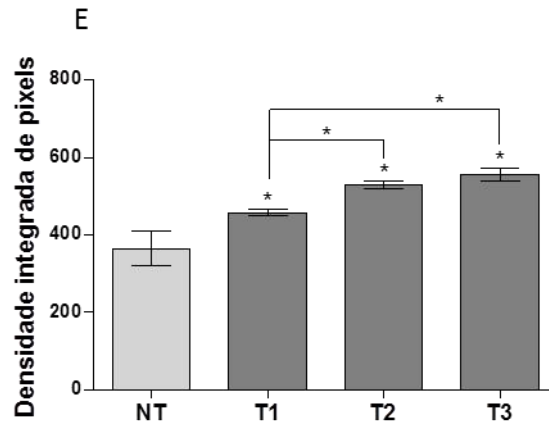
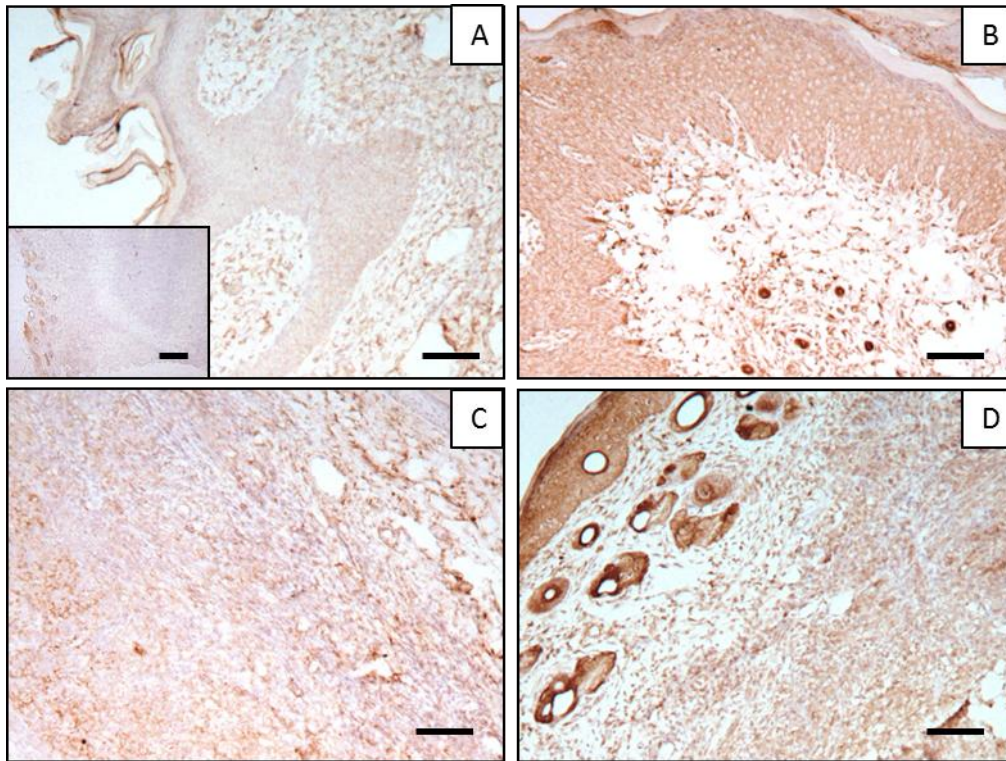


Figura 5: Marcação imunoistoquímica representativa para iNOS. A: animais não tratados (NT); B a D: Animais tratados com uma, duas e três sessões de irradiação com *laser* (T1, T2 e T3, respectivamente). Inseto: marcação controle, incubação com soro não imune. Barra de escala: 250µm. E: Os gráficos correspondem à análise quantitativa de campos microscópicos selecionados de lesões a partir de lesões tratadas e não tratadas, em termos de iNOS. Os resultados são expressos em pixels totais e representam a média ± desvio padrão de, pelo menos, cinco animais. * p < 0,05. Notar que os animais tratados com *laser* apresentaram marcações fortes para iNOS (B, C e D). Barra de escala: 100 um. Aumento 100x.

4.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O tratamento das lesões PCM com o *laser* HeNe levou a profundas alterações na atividade da superóxido dismutase (SOD) quando comparada ao grupo não tratado. Após o primeiro dia de tratamento foi observada uma diminuição na atividade da SOD nos animais tratados em relação aos não tratados (Figura 6A).

Com a progressão do tratamento a atividade da superóxido dismutase aumentou drasticamente nos animais irradiados com duas sessões de *laser* (T2) em relação aos animais não tratados, depois de 3 sessões de tratamento a atividade dessa enzima é reduzida, mas permanece significativamente maior do que nos animais não tratados (Figura 6A).

4.5 Produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) também foi alterada drasticamente com a *laser*terapia de baixa potência. Após o primeiro dia de tratamento a concentração total de NO nos animais tratados diminuiu em relação aos animais não tratados (Figura 6B).

Depois do segundo dia de irradiação, a produção de óxido nítrico aumentou significativamente nos animais tratados, confirmando o resultado visto na imunomarcagem para iNOS (Figura 5 e 6B).

Após o terceiro dia de tratamento, no entanto, a produção de NO foi diminuída, mantendo-se consideravelmente mais baixa do que o grupo não tratado (Figura 6B).

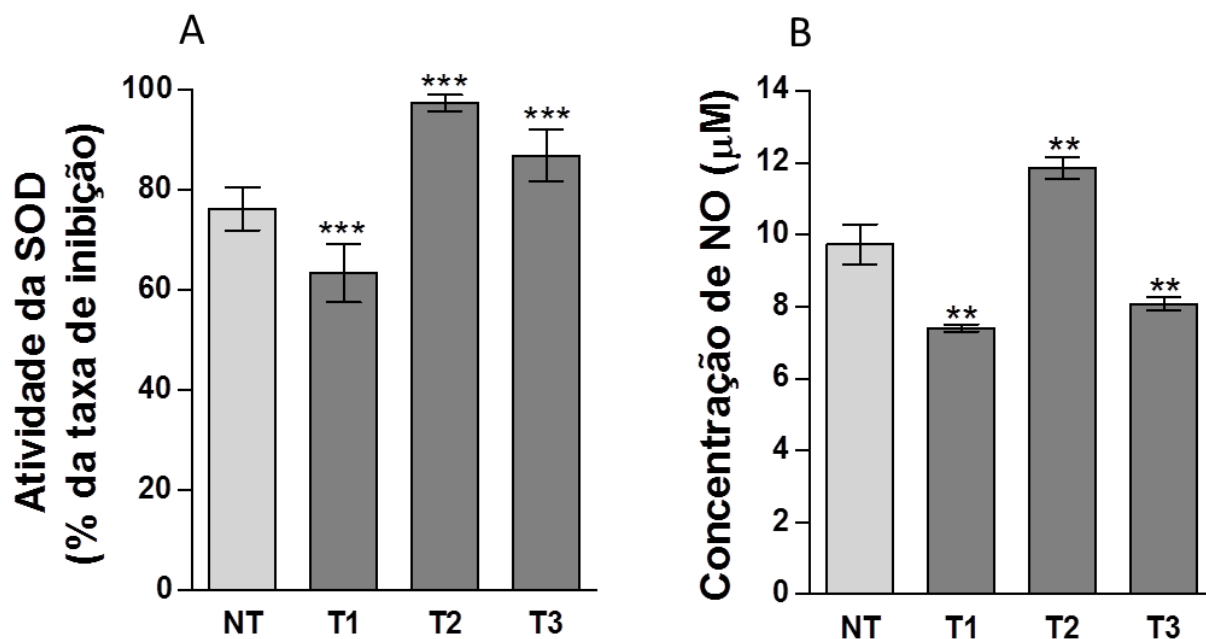


Figura 6: (A) Atividade da superóxido dismutase (SOD); (B) produção de óxido nítrico (NO). (A) a atividade da SOD foi significativamente diminuída em lesões tratadas com 1 sessão de irradiação com *laser* de HeNe (T1). Após 2 sessões de tratamento (T2), a atividade da SOD aumentou significativamente em relação ao grupo não tratado. A atividade da SOD permanece maior após três dias de tratamento (T3). (B) A produção de NO foi significativamente menor nos animais tratados com 1 sessão de irradiação (T1). Nos animais irradiados com 2 sessões de tratamento (T2) a produção de NO foi aumentada em relação aos animais não tratados. Nos animais irradiados com 3 sessões de irradiação (T3) a produção de NO foi significativamente menor do que no grupo não tratado. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão, pelo menos, cinco animais. ** P <0,01; *** p <0,0001.

4.6 Citometria de fluxo

4.6.1 Lesão PCM

As populações celulares presentes na lesão PCM experimental foram analisadas por citometria de fluxo (Figura 7).

A análise de subpopulações de linfócitos revelou um aumento significativo na porcentagem de células expressando marcadores associados a células NK e NKT logo após o primeiro dia de tratamento. À medida que o tratamento com o *laser* continua,

uma redução gradual destas subpopulações foi observada, igualando a porcentagem dessas células nos animais tratados e não tratados 9 e 10 dias após a infecção (Figuras 7A e 7D). A análise da população de fagócitos (macrófagos e neutrófilos) mostrou que estas células correspondem a mais de 80% das células totais presentes no sítio da lesão e não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figuras 7C e 7D).

A porcentagem de macrófagos aumentou nos animais tratados quando comparados aos animais não tratados, permanecendo maior nesses animais no decorrer de todo o tratamento. A porcentagem de neutrófilos, no entanto, mostrou-se significativamente menor nos animais tratados (Figuras 7B e 7D).

4.6.2 Linfonodo poplíteo

As populações celulares presentes no linfonodo poplíteo esquerdo foram analisadas por citometria de fluxo (Figuras 8 e 9).

A porcentagem dos linfócitos T CD4⁺ no linfonodo de animais que foram tratados com uma sessão de irradiação com o *laser* é significativamente menor do que a porcentagem observada no grupo não tratado correspondente. A partir do nono dia de infecção foi observada uma pequena diminuição na porcentagem dessas células no linfonodo de animais não tratados, enquanto no linfonodo dos animais tratados houve um leve aumento, fazendo com que haja um maior número dessas células nesse grupo de animais tratados quando em comparação com os animais não irradiados. Os animais tratados com 3 sessões de *laser* não apresentaram diferenças estatísticas com o grupo não tratado.

As porcentagens de linfócitos T CD8⁺ também foram alteradas, após o tratamento com 2 sessões de irradiação, um menor número dessas células foi encontrado em comparação com o grupo que não recebeu tratamento, com a continuação do tratamento foi observado uma maior quantidade dessas células nos animais tratados (T3), onde foi observado um aumento nessa população celular enquanto houve uma diminuição nos animais não tratados, quando em relação aos grupos T2 e NT2.

A população de linfócitos B (CD19⁺/CD3⁻) não sofreu alterações significativas com o tratamento realizado, se mantendo em 13% das células totais adquiridas dos linfonodos (Figuras 8B e 8C).

A análise de subpopulações de células apresentadoras de antígenos também mostrou algumas diferenças proporcionadas pelo tratamento com o *laser* HeNe (Figura 9). A porcentagem de fagócitos (macrófagos e neutrófilos) após o primeiro dia de tratamento com o *laser* é maior do que nos animais não tratados, porém após 2 e 3 sessões de irradiação essa porcentagem diminui, ficando bastante semelhante à encontrada nos grupos de animais não tratados correspondentes (Figuras 9A e 9C). A população de células dendríticas maduras, ou seja, que expressam MHC II, diferentemente do observado com os fagócitos, é semelhante nos 2 grupos no início do tratamento e só aumenta no final do tratamento, após 3 sessões de irradiação (Figuras 9B e 9C).

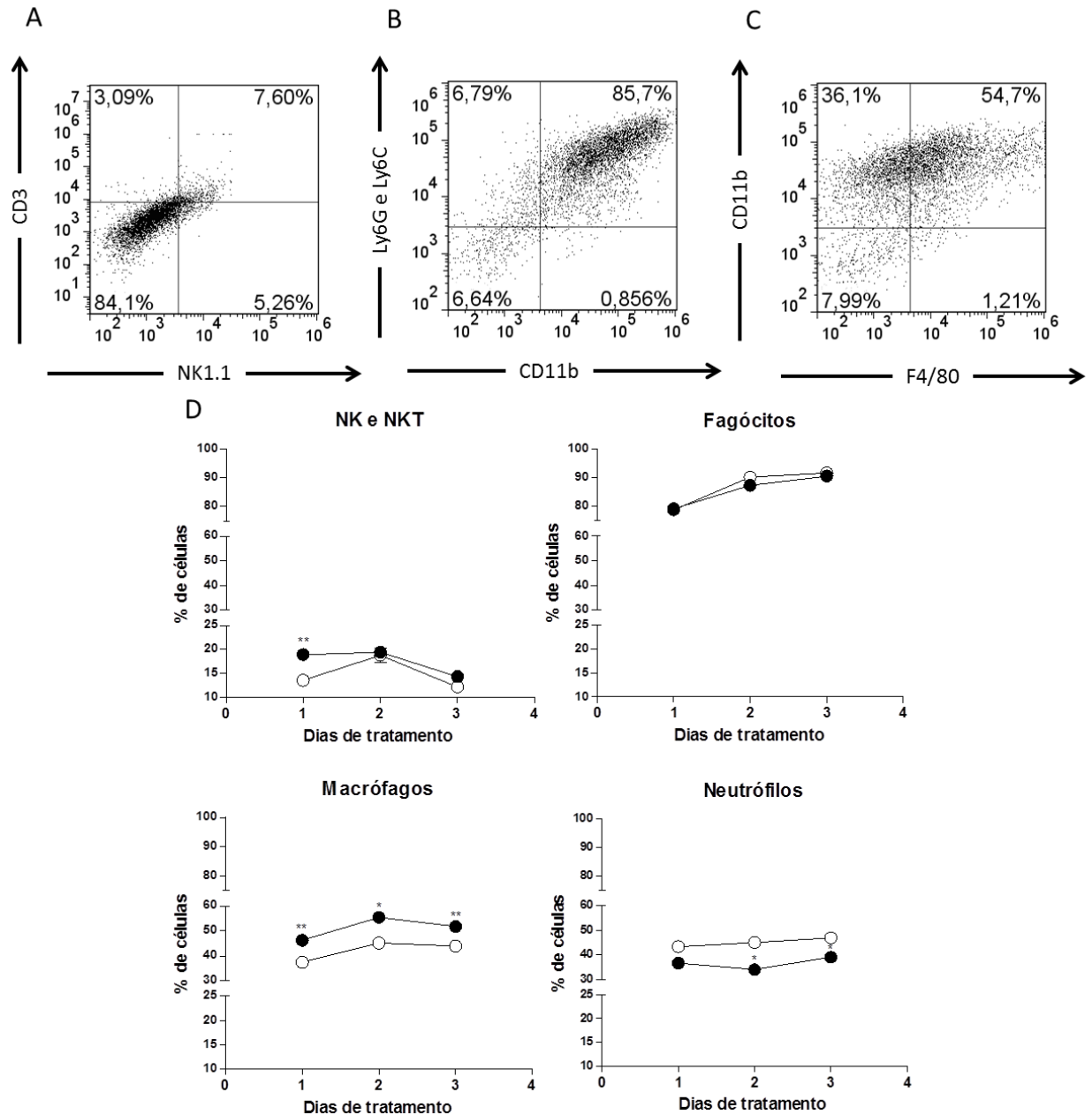


Figura 7: Análise das células na lesão PCM experimental. A, B e C: dot-plots representativos das subpopulações NK e NKT, da população de fagócitos totais, e de macrófagos e neutrófilos, respectivamente. D: porcentagem de células em lesões de animais não-tratados (○) e animais tratados com o *laser* (●). Observe que, após uma sessão de irradiação com o *laser*, a porcentagem de células NK e NKT foram maiores quando comparadas com o grupo não tratado. A população de fagócitos pode representar mais de 80% das células totais na lesão PCM experimental, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Uma maior porcentagem de macrófagos e uma menor porcentagem de neutrófilos foram detectados em animais tratados durante todo o tratamento. Os resultados são expressos como média ± erro padrão, de pelo menos, cinco animais. * P <0,05; ** P <0,01.

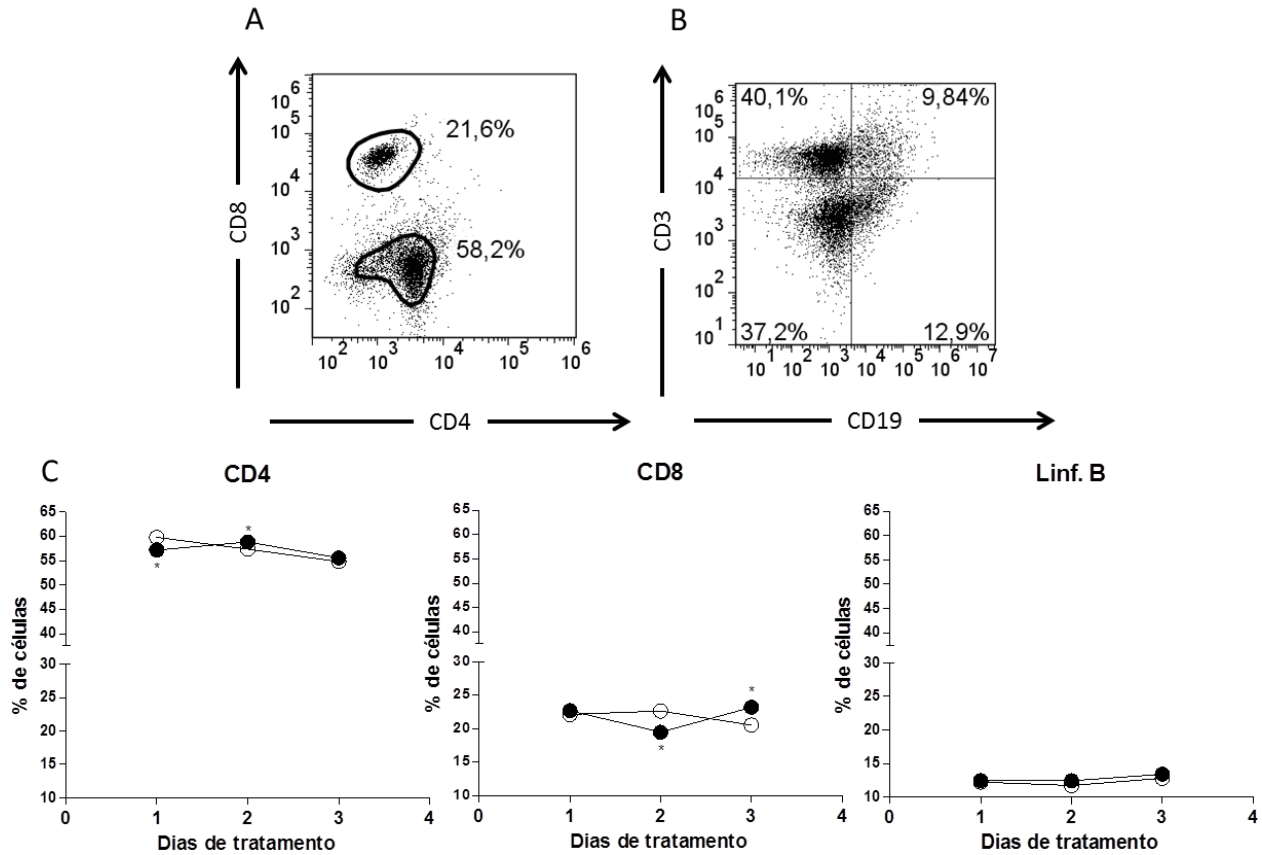


Figura 8: Análise dos linfócitos presentes no linfonodo poplíteo. A e B: dot-plots representativos das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e da subpopulação de linfócitos B, respectivamente. A: o gate CD4⁺ e CD8⁺ estão inseridos dentro do gate de células CD3⁺. C: porcentagem de células nos linfonodos de animais não-tratados (○) e animais tratados com o *laser* (●). Observe que, após uma sessão de irradiação com o *laser*, a porcentagem de células CD4⁺ é menor quando comparada com o grupo não tratado. Com a continuação do tratamento o número de células T CD4⁺ aumenta, ficando significativamente maior nos animais tratados. A porcentagem das células T CD8⁺ após 2 sessões de tratamento é menor nos animais tratados, porém com 3 sessões de irradiação ocorre um leve aumento nessa população concomitante com uma diminuição nos animais não tratados, com isso temos mais células T CD8⁺ nos animais tratados. A porcentagem de linfócitos B não apresenta diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em nenhum tempo de tratamento. Os resultados são expressos como média ± erro padrão, de pelo menos, cinco animais. * P <0,05.

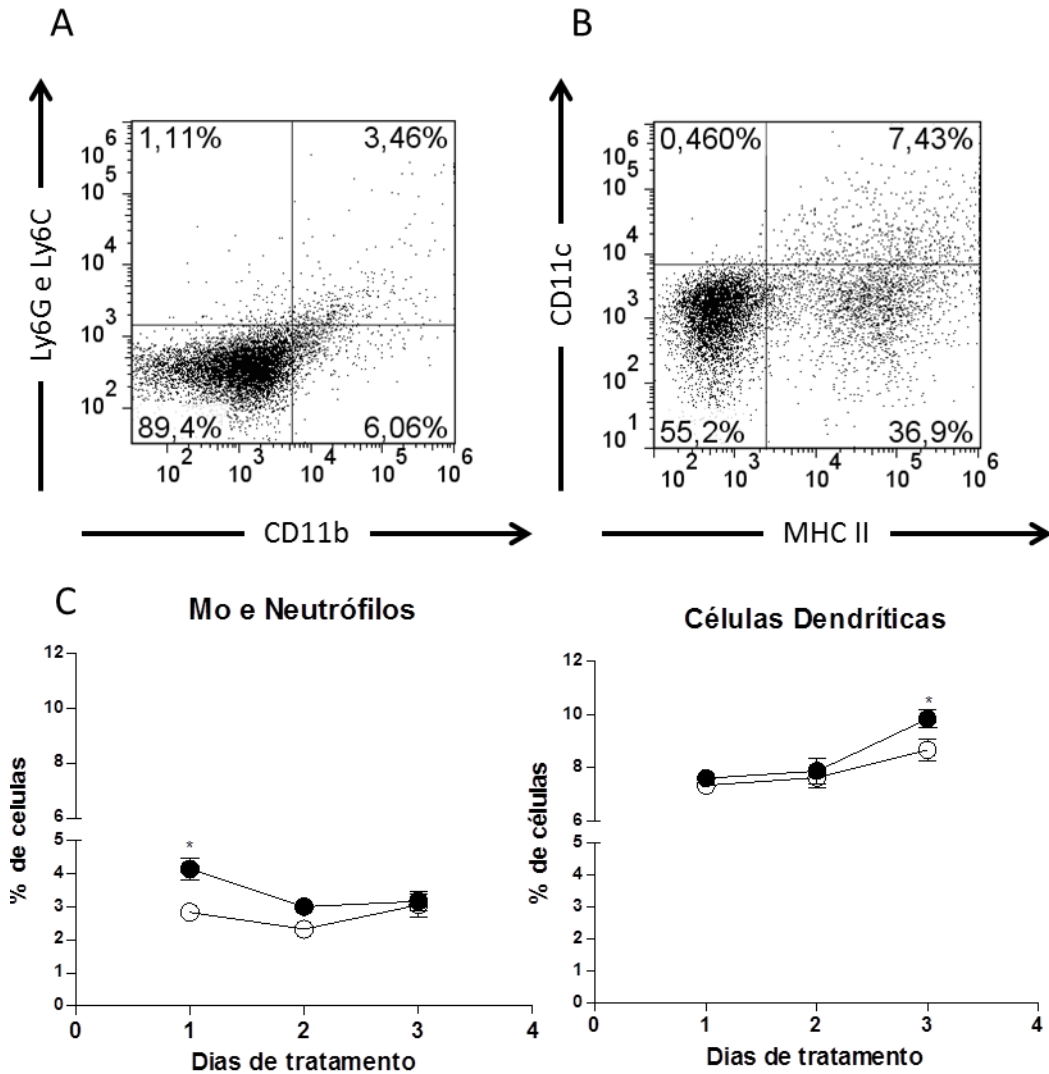


Figura 9: Análise de células apresentadoras de antígeno presentes no linfonodo poplíteo. A e B: dot-plots representativos das populações de fagócitos e da população de células dendríticas maduras, respectivamente. C: porcentagem de células nos linfonodos de animais não-tratados (○) e animais tratados com o *laser* (●). Observe que, após uma sessão de irradiação com o *laser*, a porcentagem de fagócitos é maior quando comparada com o grupo não tratado. Com a continuação do tratamento o número de fagócitos diminui até praticamente se igualar ao grupo de animais não tratados. A porcentagem das células dendríticas maduras aumenta pouco, em ambos os grupos, com a progressão da infecção, mas após 3 sessões de tratamento é maior nos animais tratados. Os resultados são expressos como média ± erro padrão, de pelo menos, cinco animais. * P <0,05.

4.7 Expressão gênica

4.7.1 Extração de RNA

Após a extração de RNA segundo o protocolo descrito no kit, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose desse material, para avaliar a integridade do ácido nucléico obtido (Figura 10).

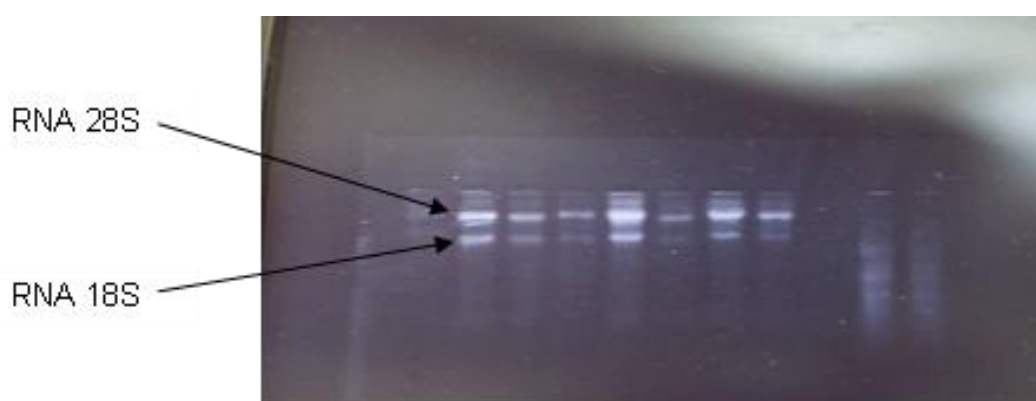


Figura 10: Fotografia em câmara escura da eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, do RNA das amostras.

A extração de RNA foi bem sucedida já que as bandas 18S e 28S das amostras se apresentaram íntegras.

4.7.2 Síntese do cDNA, quantificação, e padronização

O cDNA foi sintetizado a partir do RNAm conforme o protocolo descrito nos métodos, sendo posteriormente quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Applied Biosystem). Os valores da quantificação de cDNA estão listados na Tabela 1.

A quantificação do cDNA é necessária para estabelecer a concentração desse ácido nucléico em cada amostra e a partir desses valores utilizar a mesma quantidade de material para todas as amostras de ambos os grupos experimentais. Desta forma, é possível assegurar que, as diferenças na expressão dos genes entre os grupos experimentais, está relacionada com a expressão diferencial desses genes e não às diferenças nas quantidades utilizadas de cDNA.

Tabela 1: Quantificação de cDNA das lesões paracoccidiodomicóticas do coxim plantar da pata esquerda dos animais tratados e não tratados com o *laser* HeNe.

Grupos experimentais	Animais	cDNA (ng/μL)
Animais Tratados	#1	1342
	#2	1269
	#3	1479
	#4	1283
	#5	1388
	#6	1173
Animais Não Tratados	#1	1433
	#2	1531
	#3	1347
	#4	1562
	#5	1347
	#6	1835
	#7	1345

4.7.3 PCR em tempo real

Após a quantificação e padronização do cDNA, foram estipuladas as diferentes quantidades de cDNA necessárias para a reação de PCR tempo real. O ensaio de PCR tempo real foi realizado com primers e sondas para as quimiocinas CCL3, CCL5 e CXCL10 no aparelho ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) conforme mencionado acima. Os dados obtidos foram analisados pelo método do ciclo delta threshold $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct$ do gene alvo menos Ct do RNA 18S) (Overbergh *et al.* 2003). A análise da expressão gênica das quimiocinas inflamatórias revelou uma menor expressão gênica das quimiocinas CCL3 e CXCL10 nos animais tratados por 3 sessões de irradiação quando comparados com os animais não tratados (Figuras 11A e 11B). A expressão gênica da quimiocina CCL5 não sofreu nenhuma alteração estatisticamente significativa (Figura 11C).

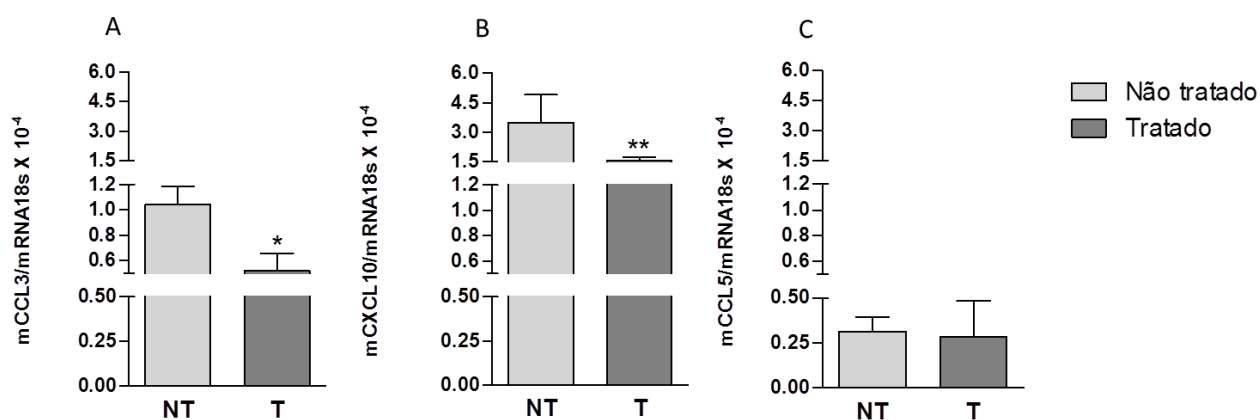


Figura 11: Expressão gênica de quimiocinas inflamatórias na lesão PCM experimental de animais não tratados e tratados com 3 sessões de irradiação com o *laser* HeNe. A: Expressão gênica da quimiocina CCL3; B: Expressão gênica da quimiocina CXCL10; C: Expressão gênica da quimiocina CCL5. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

5. Discussão

O estudo de lesões mucocutâneas na PCM é importante não só devido à sua frequência, dificuldade de tratamento e valor de diagnóstico para a doença, mas também porque elas predis põem os pacientes a infecções bacterianas secundárias (Del Negro *et al.* 1982, Franco *et al.* 1982, Lupi *et al.* 2005, Trent *et al.* 2003).

A cicatrização tecidual é um processo complexo, dependente de múltiplas interações moleculares entre células de vários tipos, envolvendo uma série de eventos, como quimiotaxia, inflamação, síntese de componentes da matriz extracelular, angiogênese, formação do tecido de granulação e remodelação tecidual (Azouz *et al.* 2004).

Devido ao desconforto provocado pelas lesões PCM e aos efeitos colaterais das drogas utilizadas, a irradiação com o *laser* HeNe pode representar uma excelente ferramenta já que suas propriedades cicatrizantes, microbidas e características não invasivas são bem conhecidas (Jovanovic *et al.* 1998, Yu *et al.* 2003, Mester 1971, Vladimirov *et al.* 2004, Gigo-Benato *et al.* 2005, Posten *et al.* 2005, Chung *et al.* 2012). Embora o mecanismo exato pelo qual a *laser*terapia exerce sua atividade não ser totalmente compreendido, é sabido que ela acelera a cicatrização, a qualidade e a resistência do tecido de cicatrização, modula a inflamação e proporciona alívio da dor em áreas de tecidos lesionados por bioestimulação de eventos celulares (Karu 1989, Pugliese *et al.* 2003, Klebanov *et al.* 2003, Vladimirov *et al.* 2004).

O efeito terapêutico do *laser* HeNe nos leucócitos, começa com reações fotoquímicas que são capazes de aumentar a capacidade fagocítica e a síntese de substância microbidas, tais como o óxido nítrico (NO) e o ânion superóxido, por um

mecanismo que envolve o aumento da permeabilidade das membranas celulares à íons como o Ca^{2+} (Chung *et al.* 2012, Klebanov *et al.* 2003, Vladimirov *et al.* 2004, Klebanov *et al.* 2005). Além disso, sob a ação do *laser* HeNe a enzima superóxido dismutase (SOD), que é responsável por catalisar a reação que converte radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (importante microbicida), é reativada (Vladimirov *et al.* 2004, Klebanov *et al.* 2005, Lubart *et al.* 2005). Os resultados histopatológicos apresentados aqui mostram que o tratamento das lesões com o *laser* foi eficiente em acelerar a cicatrização tecidual, já que é possível observar na epiderme e na derme superficial, uma melhor organização histológica, uma maior deposição de colágeno a partir de duas sessões de tratamento, assim como a formação do tecido de granulação, características de processos de fibrogênese. Estes resultados estão de acordo com o encontrado na literatura onde a fotoestimulação do *laser* aumenta a síntese de colágeno entre outros efeitos (Ferreira *et al.* 2006, Reddy *et al.* 1998, Saperia *et al.* 1986, Silveira *et al.* 2011). Trabalhos anteriores do nosso grupo observaram que a epiderme e a derme voltam à aparência histológica normal em animais tratados com três sessões de irradiação, após 12 dias da infecção e a síntese de colágeno é maior assim como nota-se presença de um denso tecido de granulação (Ferreira *et al.* 2006). Além desses efeitos, as lesões que foram tratadas com três sessões de irradiação apresentaram menos células de leveduras viáveis e esse fato certamente minimiza os efeitos na derme da infecção fúngica.

As células NK e NKT são uma subpopulação de linfócitos que possuem papel crucial na proteção a patógenos. Na PCM experimental, as células NK são bastante efetivas durante a fase precoce da doença e estão envolvidas na resistência natural do

hospedeiro ao fungo, já que elas podem ser fontes em potencial de interferon-gamma (IFN- γ) e do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) na fase inicial da infecção (Dunn *et al.* 1991, Levitz *et al.* 1996, Pagliari *et al.* 2010, Peraçoli *et al.* 1991, Peraçoli *et al.* 1995). Estudos mostram células NK produzindo IFN- γ na fase inicial da infecção por *Lysteria monocytogenes* em camundongos (Dunn *et al.* 1991). Além disso, a expressão gênica do IFN- γ e sua liberação por células T e NK humanas frente a um estímulo com *C. neoformans* e *C. albicans*, foi demonstrada (Levitz *et al.* 1996). Nossos resultados mostraram um pequeno aumento na porcentagem das células NK e NKT nos animais irradiados com uma sessão de *laser*, nos demais tempos de tratamento diferenças significativas não foram observadas. Trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório detectaram um aumento na produção de IFN- γ nos animais tratados com o *laser*, o que em parte pode ser produto de células NK (Ferreira *et al.* 2006). O aumento na quantidade dessas células nos animais tratados com uma sessão de irradiação pode ser resultado de uma maior atração dessas células para a lesão, ajudando a controlar e impedir a disseminação do patógeno tanto por induzir a morte diretamente quanto por produzir IFN- γ , importante na ativação de fagócitos. As porcentagens linfocitárias presentes no linfonodo poplíteo também foram alteradas com o tratamento, levando a flutuações das populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ distintas das apresentadas nos linfonodos poplíteos de animais não tratados. Essas flutuações distintas estão relacionadas a um padrão de ativação e migração dessas células, diferente nos animais tratados, onde o *laser* atua de forma a antecipar a migração e ativação dos leucócitos presentes na lesão, o que

leva a uma aceleração do processo inflamatório como um todo, alterando os padrões celulares do linfonodo regional, responsável por drenar os conteúdos da lesão PCM.

A presença prolongada de neutrófilos em lesões PCM tem sido relatada (19 Franco *et al.* 1982, 38 Calich *et al.* 1985, 39 Acorci *et al.* 2009). No entanto, os neutrófilos são menos eficientes na eliminação do *Paracoccidioides brasiliensis*, quando em comparação com os macrófagos, uma vez que muitos deles são susceptíveis à infecção devido a deficiências no processo de fagocitose do patógeno, cuja causa ainda não foi determinada (Goihman-Yahr *et al.* 1980, Dias *et al.* 2008). Aqui, observou-se que as lesões tratadas com o *laser* apresentam uma porcentagem reduzida de neutrófilos e um aumento significativo na porcentagem de macrófagos. A menor porcentagem de neutrófilos pode estar associada à menor quantidade de leveduras encontrada nas lesões tratadas, com isso possivelmente teremos uma diminuição na produção de IL-8, que está intimamente relacionado à presença prolongada de neutrófilos em lesões PCM (Acorci *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2006).

Estudos recentes têm mostrado que os neutrófilos podem lançar mão de uma terceira estratégia para destruir microrganismos, além da formação dos produtos do "burst oxidativo" e da descarga do seu conteúdo granular. Este novo mecanismo envolve a liberação de redes extracelulares por neutrófilos ativados, conhecidas como neutrophil extracellular traps (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) (Brinkmann *et al.* 2004). As NETs são compostas por fibras que contêm cromatina, histonas e várias outras proteínas granulares como a proteína bactericida de aumento de permeabilidade (BPI, do inglês *Bactericidal/permeability-increasing protein*), a elastase e mieloperoxidase (Brinkmann *et al.* 2004). Os mecanismos que precedem a formação

das NETs são desconhecidos. No entanto, existem claras evidências que neutrófilos ativado pelos diferentes patógenos ou por outros estímulos como IL-8, LPS, PMA, IFN- γ mais C5a ou GM-CSF mais C5a, resultam na ativação da NADP oxidase e na formação de espécies reativas do oxigênio como o ânion superóxido ou H₂O₂, necessários para sinalizar a indução de um programa de morte celular diferente da apoptose ou necrose, que envolve a elaboração das NETs, que além de envolver e/ou destruir microrganismos, aumentam a resposta inflamatória (Brinkmann *et al.* 2004).

A produção de elastase revelou uma alta expressão tanto nas lesões de animais não tratados quanto nas lesões de animais tratados com o *laser*, no entanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Os macrófagos possuem um papel central na cicatrização de lesões e constituem a principal célula fagocítica no reparo tecidual, removendo além dos patógenos, fragmentos (debris) remanescentes de tecidos, células e matriz (Leibovich *et al.* 1975, Martin 1997). Quando ativados no local da lesão, secretam grandes quantidades de fatores de crescimento e citocinas, amplificando os sinais iniciais liberados pela desgranulação de plaquetas e neutrófilos (Martin 1997). Alguns desses fatores de crescimento, como o FGF e o VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) estimulam a proliferação de células endoteliais, que provavelmente possuem atividade pró-angiogênica em situações de cicatrização tecidual (Martin 1997). A plasticidade fagocítica dos macrófagos também é maior do que a dos neutrófilos, que muitas vezes são incapazes de fagocitar as leveduras do *Pb* devido ao tamanho destas, enquanto os macrófagos são capazes de se fundir e diferenciar em células multinucleadas, como os gigantócitos, capazes de fagocitar muitas leveduras. Assim, o

maior número de macrófagos em lesões tratadas com o *laser* pode indicar uma resposta antifúngica mais eficiente bem como um processo de cicatrização mais avançado, o que é consistente com os achados histopatológicos. No linfonodo poplíteo a porcentagem de fagócitos é maior nos animais tratados com uma sessão de irradiação, provavelmente a ativação e atração dessas células para o linfonodo regional é maior e com isso o processo de cicatrização é acelerado. A porcentagem de células dendríticas nos linfonodos de animais tratados também aumenta após 3 sessões de tratamento com o *laser*, o que também está relacionado a uma aceleração da cicatrização, dada a importância dessas células enquanto apresentadoras de antígenos profissionais.

Está bem estabelecido que os macrófagos ativados matam patógenos fagocitados por converter oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio (ROS), e através da produção de intermediários do nitrogênio, particularmente do óxido nítrico (NO), através da ação de uma enzima denominada sintase de óxido nítrico induzida (iNOS). De fato, no modelo experimental de PCM utilizado, os camundongos irradiados com o *laser* apresentam aumento significativo na expressão da proteína iNOS.

A produção de NO após a irradiação com o *laser* pode ser devida a dois diferentes mecanismos. O NO pode ser produzido enzimaticamente após um aumento na atividade de sintases de NO, que ocorre após mudanças fisiológicas trazidas pela irradiação, nesse caso o aumento da produção de NO será detectado bem depois da irradiação, e com isso a natureza radical desse NO não tem conexão com a reação fotoquímica da irradiação. No entanto se o NO é liberado por uma reação fotoquímica direta, a sua liberação ocorrerá durante ou imediatamente após a irradiação, e com a

tendência do NO a se combinar com superóxido, quase sempre será detectado uma diminuição na produção de NO, a não ser que sua produção exceda a produção de superóxido advinda da irradiação. Na maioria dos casos, a irradiação com o *laser* vai levar a uma diminuição na concentração de NO encontrado por levar a liberação de superóxido (Lubart *et al.* 2005, Vladimirov *et al.* 2004).

A diminuição na produção de NO detectada nas lesões tratadas com uma sessão de irradiação com o *laser* é, portanto, uma provável consequência da liberação de superóxido advinda da irradiação com o *laser*. No entanto, após 2 sessões de irradiação, foi observado um aumento na concentração de NO nas lesões tratadas, o que está diretamente relacionado a maior expressão de iNOS encontrada, já que esta levará a liberação de NO mais tardiamente do que a ocasionada pela reação fotoquímica direta. Este aumento na liberação de NO, observado em animais tratados com o *laser*, está certamente relacionado a uma maior atividade anticíclica dos macrófagos e aumento na resistência à PCM, como já foi observado por outros autores (Gonzalez *et al.* 2000, Moreira *et al.* 2008). O nosso modelo experimental também revelou que, após três sessões de irradiação com o *laser*, a liberação de NO é reduzida. Isto pode estar relacionado a uma cicatrização acelerada devida a uma maior eliminação do patógeno, que culmina em um processo inflamatório mais brando. De fato, a literatura demonstra que uma superprodução de NO, ou uma produção contínua por um longo período, pode aumentar a susceptibilidade do hospedeiro ao fungo tornando difícil a cicatrização de feridas (Nascimento *et al.* 2002, Nishikaku *et al.* 2009). Experimentos *in vitro* estão sendo realizados para avaliar a produção de NO, peroxinitrito e radicais superóxido em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos,

e em seguida tratados com o *laser* HeNe, tais resultados certamente vão contribuir para nossa compreensão sobre os efeitos da *laser*terapia sobre os macrófagos.

Os dados apresentados aqui também mostraram diferenças significativas entre os animais tratados com o *laser* e aqueles não tratados, em relação à superóxido dismutase (SOD). A produção de ROS, principalmente o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é importante na eliminação de microrganismos e na fase inflamatória da cicatrização tecidual, no entanto quando em altas concentrações o O_2^- pode danificar biomoléculas e retardar o processo de cicatrização. A SOD é a enzima responsável por catalisar a dismutação de radicais superóxido ($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) e esta reação pode desempenhar um papel importante na lesão PCM por duas razões. A primeira razão é que altas concentrações de superóxido (O_2^-) podem atrasar o processo de cicatrização devido à interação desse ânion com o NO, formando peroxinitrito que conseqüentemente leva a formação do radical hidroxil, que é altamente citotóxico (Ducrocq *et al.* 1999, Klebanov *et al.* 2005). A segunda razão é que o aumento na geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) desempenha um importante papel na eliminação de micróbios (Carmo *et al.* 2006, Rodrigues *et al.* 2007, Moreira *et al.* 2008).

No entanto, após o primeiro dia de tratamento, a atividade da SOD diminuiu em relação ao observado nas lesões de animais não tratados, o que pode estar relacionado a uma maior proliferação celular e atividade fagocitária dos leucócitos após essa primeira sessão de irradiação, levando a uma diminuição na produção de superóxido e, por conseguinte, menor atividade da SOD, que é uma enzima induzível cuja atividade é dependente da concentração de O_2^- . Essa redução inicial na produção

de superóxido também pode estar associada a um mecanismo de reabsorção mitocondrial, onde o ânion superóxido atua como fonte de elétrons para a fosforilação oxidativa do ADP (Mailer *et al.* 1990). Após 2 e 3 sessões de irradiação, a atividade da SOD aumenta consideravelmente nas lesões de animais tratados, resultando assim, em uma redução na concentração de superóxido, o que acelera a cicatrização da lesão, e uma maior liberação de H₂O₂ que é um importante mediador inflamatório envolvido na resistência contra o *P. brasiliensis* (Kerkweg *et al.* 2007, Phan *et al.* 2001, Rodrigues *et al.* 2007, Silveira *et al.* 2007).

O papel das quimiocinas inflamatórias CCL3, CCL5 e CXCL10 investigadas é a quimioatração de neutrófilos, linfócitos e monócitos. A menor expressão gênica das quimiocinas CCL3 e CXCL10 encontrada nas lesões de animais tratados com 3 sessões de irradiação aponta para um processo inflamatório bem controlado onde temos uma cicatrização mais acelerada. O dano tecidual está intimamente relacionado à inflamação aguda e a entrada de neutrófilos, que constituem aproximadamente 50% da população celular presente nos machucados no primeiro dia após o dano ocorrer (Posten *et al.* 2005). A maior expressão de CXCL10 nas lesões não tratadas está relacionada a uma resposta inflamatória mais intensa associada ao recrutamento de linfócitos, retardando a re-epitelização e prolongando a fase de granulação (Engelhardt *et al.* 1998, Posten *et al.* 2005). A menor expressão de CCL3 nas lesões tratadas indica um menor recrutamento de macrófagos, já que a infecção PCM já está bem controlada e a cicatrização está mais adiantada do que nas lesões não tratadas.

Os efeitos da ação direta do *laser* HeNe sobre leveduras do *Paracoccidioides brasiliensis* também foi avaliado no nosso laboratório e os resultados mostraram que o

laser HeNe é capaz de modificar ou até mesmo destruir estruturas fúngicas que são usadas pelos patógenos como mecanismos de resistência. Certamente essa atividade fungistática/fungicida do *laser* também desempenha um papel importante na aceleração do processo de cicatrização da lesão PCM.

Coletivamente esses resultados apontam para um efeito duplo do tratamento com o *laser*, diminuindo a resposta inflamatória e acelerando a cicatrização das lesões. O *laser* HeNe pode configurar uma nova estratégia inócua para ser usada como uma ferramenta adjuvante aos tratamentos antifúngicos disponíveis para melhorar o tratamento das lesões PCM.

Os dados obtidos nesse trabalho esclarecem os efeitos da ação biológica obtida com a LLLT no tratamento de lesões PCM experimentais, mostrando que a irradiação com o *laser* HeNe é capaz de promover uma cicatrização mais rápida da lesão com eliminação do agente patogênico, trazendo nova luz para o tratamento das lesões mucocutâneas de pacientes humanos de forma adjuvante ao tratamento sistêmico convencionalmente aplicado.

Referências

- Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AM. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. *Scand J Immunol* 69(2): 73-9, 2009.
- Ajello L. Medically important infectious fungi. *Contrib Microbiol Immunol*, 3: 7-19, 1977.
- Almeida, FP de – Estudo comparativo do Granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. *An Fac Med S Paulo* 4: 91-98, 1929.
- Almeida SR, Aroeira LS, Frymuller E, Dias MA, Bogsan CS, Lopes JD, Mariano M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int. Immunol* 13: 1193–1201, 2001.
- Andriole VT. The 1998 Garrod lecture. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 44(2): 151-162, 1999.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med. Electron. Microsc.* 37(3): 141-8, 2004.
- Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 38(8): 2940-2, 2000.
- Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low level *laser* therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother* 49(2): 107-16, 2003.

- Borelli D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. Pan American Health Organization. Scientific Publication 254: 59-64, 1972.
- Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol 10(2): 80-7, 2002.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303(5663): 1532-5, 2004.
- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. J Immunol 140(8): 2786-9, 1988.
- Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. Mycopathologia 109(1): 13-7, 1990.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev 6: 89–117, 1993.
- Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol 66(5): 585-94, 1985.
- Calich VLG, Singer-Vermes LM, Russo M, Vaz CAC & Burger E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo AM & Del Negro G (Editors), Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton 151-178, 1994.

- Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol* 44(4): 363-8, 2006.
- Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level *laser* therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One* 6(7): e22453, 2011.
- Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Efficacy of low-level *laser* therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet* 374(9705): 1897-908, 2009.
- Christie A, Jamtvedt G, Dahm KT, Moe RH, Haavardsholm EA, Hagen KB. Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for patients with rheumatoid arthritis: an overview of systematic reviews. *Phys Ther* 87(12): 1697-715, 2007.
- Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level *laser* (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 40(2): 516-33, 2012.
- Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol* 135(6): 1607-17, 1989.
- Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 43: 25–30, 2007
- Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AD. Paracoccidioidomycosis. *U.S.P. Sarvier* 97-105, 1982.

- De Moraes Borba C, Schäffer GM. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses* 45(5-6): 174-9, 2002.
- Dias MF, Mesquita J, Filgueira AL, De Souza W. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. *Med Mycol.* 46(3): 241-9, 2008.
- Ding AH, Nathan CF, and Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal-macrophages - comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol* 141: 2407-2412, 1988.
- DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 101(8): 1693-8, 1998.
- Dollery F, ed. Therapeutic – Drugs-itraconazol. London: Churchill Livingstone, suppl. 1: 114-119, 1992
- Ducrocq C, Blanchard B, Pignatelli B, Ohshima H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci* 55(8-9): 1068-77, 1999.
- Dunn PL, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* 59(9): 2892-900, 1991.
- el Sayed SO, Dyson M. Effect of *laser* pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. *Lasers Surg Med* 19(4): 433-7, 1996.

- Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 153: 1849–1860, 1998.
- Ferreira MC, Brito VN, Gameiro J, Costa MR, Vasconcellos EC, Cruz-Hofling MA, Verinaud L. Effects of HeNe *laser* irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *Photochem Photobiol* 84(2): 141-149, 2006.
- Ferreira MC, Gameiro J, Nagib PR, Brito VN, Vasconcellos Eda C, Verinaud L. Effect of low intensity helium-neon (HeNe) *laser* irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. *Photochem Photobiol* 85(1): 227-33, 2009.
- Franco MF, Montenegro MR. Anatomia Patológica. In Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM, eds. Paracoccidioidomicose – blastomicose sul-americana. Sarvier- DUSP, 97, 1982.
- Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso M, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Baillières Clinical Tropical Medicine Communicable Diseases* 4: 185-220, 1989.
- Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. The effects of low *laser* irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol* 19(1): 43-8, 2004.
- Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve* 31(6): 694-701, 2005.
- Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69(4): 513-21, 2001.

- Goihman-Yahr M, Essenfled-Yahr E, de Albornoz MC, Yarzabal L, de Gómez MH, San Martín B, Ocanto A, Gil F, Convit J. Defect of *in vitro* digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 28(2): 557-66, 1980.
- Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 68(5): 2546-52, 2000.
- Greco M, Guida G, Perlino E, Marra E, Quagliariello E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon *laser*. *Biochem Biophys Res Commun* 163(3): 1428-34, 1989.
- Hamdan JS, de Resende MA. Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 102(2): 97-105, 1988.
- Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon *laser* irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 23(3): 251-9, 2005.
- Herzenberg, LA, Kantor, AB. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol Today* 14: 79–83 discussion 88-90, 1993.
- Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 9(4): 602-18, 2011.
- Jamtvedt G, Dahm KT, Christie A, Moe RH, Haavardsholm E, Holm I, Hagen KB. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews. *Phys Ther* 88(1): 123-36, 2008.

Jovanovic L, Mirkovic B, Zivkovic B. Soft *laser* in the therapy of herpes simplex labialis. *Med and Biol* 5(1): 61-63, 1998.

Karu, TI. Photobiological fundamentals of low-power *laser* therapy. *IEEE J Quantum Electron* 23: 1703–1717, 1987.

Karu T. Photobiology of low-power *laser* effects. *Health Phys* 56(5): 691-704, 1989.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 49(1): 1-17, 1999.

Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 23(4): 355-61, 2005.

Kashino SS, Singer-Vermes LM, Calich VL, Burger E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its *in vitro* growth. *Mycopathologia* 111(3): 173-80, 1990.

Kerkweg U, Petrat F, Korth HG. Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *Shock* 27: 552–558, 2007.

Klebanov GI, Kreinina MV, Chukaeva II, Barbarash OL, Korochkin IM, and Vladimirov YA. Changes in the superoxide dismutase activity during stimulation of polymorphonuclear leukocytes of peripheral blood. . *Biull Eksp Biol Med*109(4): 334-6, 1990.

Klebanov GI, Poltanov EA. Primary free-radical and secondary molecular-cellular mechanisms behind *laser* therapy. *Laser Physics* 13(1): 70-83, 2003.

- Klebanov GI, Poltanov EA, Chichuk TV, Osipov AN, Vladimirov YA. Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne *laser* radiation. *Biochemistry (Mosc)* 70(12): 1335-40, 2005.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT, eds. *Tratado de Micologia Medica Lacaz*. 9th ed. São Paulo Sarvier Publishers 639-729, 2002.
- Lavalle P, Suchil P, De Ovando F, Reynoso S. Itraconazole for deep mycoses: preliminary experience in Mexico. *Rev Infect Dis* 1:S64-70, 1987.
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78(1): 71-100, 1975.
- Levitz SM, North EA. gamma Interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun* 64(5): 1595-9, 1996.
- Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. *Am J Med* 52(6): 771-5, 1972.
- Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesi JL, De Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res* 27(9): 2309-13, 1994.
- Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy *laser* irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 23(1): 3-9, 2005.

- Lupi O, Tyring SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol* 53(6): 931-51, 2005.
- Macoris SA, Sugizaki MF, Peraçoli MT, Bosco SM, Hebeler-Barbosa F, Simões LB, Theodoro RC, Trinca LA, Bagagli E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(3): 331-4, 2006.
- Mailer K. Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1): 59-64, 1990.
- Marques SA. Paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol* 73(5): 455-69, 1998.
- Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276(5309): 75-81, 1997.
- McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25(3): 165-75, 1987.
- McGuff PE, Bushnell D, Soroff HS, Deterling RA Jr. Studies of the surgical applications of *laser* (light amplification by stimulated emission of radiation). *Surg Forum* 14: 143-5, 1963.
- Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level *laser* therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 32(3): 239-44, 2003.

- Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton 373-92, 1994.
- Mester E, Szende B, Tota JG. Effect of *laser* on hair growth of mice. *Kiserl Orvostud* 19: 628–631, 1967.
- Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of *laser* rays on wound healing. *Am J Surg* 122: 532-535, 1971.
- Mester E, Szende B, Spiry T, Scher A. Stimulation of wound healing by *laser* rays. *Acta Chir Acad Sci Hung* 13: 315–324, 1972.
- Mester E, Nagylucskay S, Döklen A, Tisza S. *Laser* stimulation of wound healing. *Acta Chir Acad Sci Hung* 17: 49–55, 1976.
- Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia* 166(1): 17-23, 2008.
- Moschardi-Bacchi, M., Franco, M. Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 101-108, 1985.
- Muchmore HG, McKown BA, Mohr JA. Effects of the steroid hormones on the proliferation of *Paracoccidioidomycosis brasiliensis*. *Bol Oficina Sanit Panam* 77(1): 55-70, 1974.

- Najib PR, Gameiro J, Alves da Costa T, Gangi R, Ribeiro JS, Paulino L, Verinaud L. Effect of HeNe *laser* irradiation on extracellular matrix deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccidioidomycotic lesions. *Photochem Photobiol* 86(4): 920-4, 2010.
- Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol* 28(1): 67-76, 1990.
- Nascimento FR, Calich VL, Rodríguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 168(9): 4593-600, 2002.
- Nishikaku AS, Molina RF, Ribeiro LC, Scavone R, Albe BP, Cunha CS, Burger E. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 198(2): 123-35, 2009.
- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R and Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14: 33-43, 2003.
- Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MI, Sotto MN. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol* 37(5): 565-570, 2010.
- Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, Cingolani A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by helium-neon *laser*. *FEBS Lett* 175(1): 95-9, 1984.

- Peraçoli MT, Soares AM, Mendes RP, Marques SA, Pereira PC, Rezkallah-Iwasso MT. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 29(6): 373-80, 1991.
- Peraçoli MT, Fortes MR, Da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37(2): 129-36, 1995.
- Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power *laser* irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 31(4): 263-7, 2002.
- Phan TT, Wang L, See P, Grayer RJ, Chan SY, Lee ST. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biol Pharm Bull* 24(12): 1373-9, 2001.
- Phillips HJ. Dye exclusions tests for cell viability. In: *Tissue culture, methods and applications*, Kruse JR, Patterson JRMK. (eds). A.P.:New York, 406-408, 1973.
- Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level *laser* therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg* 31(3): 334-40, 2005.
- Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low-level *laser* therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras* 17(4): 307-313, 2003.
- Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level *lasers* as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 32(7): 714-9, 2005.

- Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 22: 281-287, 1998.
- Restrepo A, Robledo M, Gutiérrez F, Sanclemente M, Castañeda E, Calle G. Paracoccidioidomycosis, (South American blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 19(1): 68-76, 1970.
- Restrepo A, Greer DL, & Vasconcellos M. Paracoccidioidomycosis: a review. *Review of Medical and Veterinary Mycology* 8: 97-123, 1973.
- Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23: 323–334, 1985.
- Restrepo A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: *Paracoccidioidomycosis* (M. Franco, CS Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. del Negro, ed.), CRC Press, Boca Raton 121-130, 1994.
- Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med Mycol* 38(4): 317-22, 2000.
- Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39(3): 233-41, 2001.
- Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 29(2): 182-97, 2008.
- Rivitti EA, Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol* 17: 171–90, 1999.

- Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol* 45(1): 27-33, 2007.
- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18: 217-42, 2000.
- San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathol* 62(2): 77-86, 1977.
- San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. *Mycopathol* 79(3): 159-84, 1982.
- San-Blas G, San-Blas F, Ordaz D, Centeno S, Albornoz MC. Chemical changes in cell wall structure of five strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 22(3): 255-7, 1984.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40(3): 225-42, 2002.
- Saperia D, Glassberg E, Lyons RF, Abergel RP, Baneux P, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with He-Ne laser. *Biochem Biophys Res Commun* 138(3): 1123-1128, 1986.
- Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CF. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 67(2): 115-118, 1979.

- Shebzukhov IuV, Vařsburd Mlu, Artiushkin KV, Mysiakin EB. Synthesis of nitric oxide by mouse peritoneal macrophages induced by C-reactive protein. *Biull Eksp Biol Med* 125(1): 48-50, 1998.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, e grupo de consultores do consenso em paracoccidioidomicose et al. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 297-310, 2006.
- Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level *laser* therapy. *J Photochem Photobiol B, Biol* 86(3): 279-82, 2007.
- Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power *laser* irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 26(1): 125-31, 2011.
- Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity *laser* activation: *lasers*, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg* 19(1): 29-33, 2001.
- Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 156(5): 1811-20, 2000.
- Stover EP, Schär G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 51(1): 199-203, 1986.

- Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol* 76(2): 164-70, 2002.
- Trent JT, Kirsner RS. Identifying and treating mycotic skin infections. *Adv Skin Wound Care* 16(3): 122-9, 2003.
- Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg* 53(4): 442-447, 1995.
- Vicentini AP, Gesztesi J-L, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD.. Binding of *P. brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62(4): 1465-9, 1994.
- Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of *laser* radiation. *Biochem (Mosc)* 69(1): 81-90, 2004.
- Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(10): 4220-4, 1991.
- Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds) *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton 109-120, 1994.
- Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 6(3): 385-97, 2005.
- Yu H, Chang KL, Yu CL, Chen JWV, Chen GS. Helium neon *laser* irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *J Invest Dermatol* 120: 56-64, 2003.

Zacharias D, Ueda A, Moscardi-Bacchi M, Franco M, San-Blas G. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. J Med Vet Mycol 24(6): 445-54, 1986.

Artigo: **Effect of HeNe *Laser* Irradiation on Extracellular Matrix Deposition and Expression of Cytokines and Chemokines in Paracoccidioidomycotic Lesions.**

Artigo publicado em Photochemistry and Photobiology, 86: 920–924, 2010.

DOI: 10.1111/j.1751-1097.2010.00734.x

Effect of HeNe Laser Irradiation on Extracellular Matrix Deposition and Expression of Cytokines and Chemokines in Paracoccidioidomycotic Lesions

Patrícia R. A. Nagib^{1†}, Jacy Gameiro^{2†}, Thiago Alves da Costa³, Rosária Di Gangi³, Júlia da Silva Ribeiro³, Luciana Campos Paulino⁴ and Liana Verinaud^{*3}

¹Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás-UFG, Goiania, Goiás, Brazil

²Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora-UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

³Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Institute of Biology, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴Natural and Human Sciences, Federal University of ABC-UFABC, São Paulo, Brazil

Received 11 November 2009, accepted 22 February 2010, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2010.00734.x

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is the most prevalent human mycosis in Latin America. Cutaneous lesions are extremely painful and sensitive, and current treatment with antifungal drugs is lengthy and may cause side effects to patients. In this perspective, the helium-neon (HeNe) laser emerges as a novel therapy form due to its ability to heal wounds without changing cell function. In this work, we evaluate the effects of HeNe laser irradiation on extracellular matrix deposition and expression of cytokines and chemokines in cutaneous lesions caused by experimental infection of Balb/c mice. Our results showed decreased levels of pro-inflammatory interleukin (IL)-17 and tumor necrosis factor- α , and of anti-inflammatory IL-10 cytokines in lesions exposed to HeNe laser irradiation. Chemokines CCL3 and CXCL10 showed decreased levels in laser-treated lesions, but no significant difference was observed in relation to CCL5 expression. We also detected decreased density of fibronectin and laminin in HeNe laser-treated lesions. Data presented herein support the validity of our previous results suggesting positive effects of HeNe laser in accelerating wound healing in this experimental model. We believe that HeNe laser is a new nonharmful strategy that may be used as adjuvant and/or alternative therapy for improving treatment of paracoccidioidomycotic lesions.

INTRODUCTION

The most important systemic mycosis in Latin America is paracoccidioidomycosis (PCM) caused by the thermophilic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The lungs are the first place of infection because the inhalation of infecting propagules and their dissemination occur, lately, *via* bloodstream and/or lymphatic routes affecting other organs (1,2). The skin may be also affected by infection which induces cutaneous lesions that are extremely painful and sensitive, and remains

active for months even after the beginning of treatment with antifungal drugs. Furthermore, these lesions can progress to ulcerative wounds with damage to epithelial cells and predisposition to secondary bacterial infection (3,4).

The conventional treatment for cutaneous lesions in PCM is based on antifungal drugs that induce side effects in humans. This is a long-term treatment and its efficiency has been criticized. In general, the patients who present wounds still suffer with the discomfort for a long time. However, new advances in complementary and alternative treatments are underway and a promising candidate is the low-level laser therapy (LLLT) which could facilitate and maximize patient healing without toxic effects (5).

In this perspective, the helium-neon (HeNe) laser may emerge as a novel therapy form due to its microbicidal activity and its ability to heal wounds without changing cell function (6,7). The exact mechanism of LLLT remains unclear, but it is known that it speeds up and improves the quality and tensile strength of tissue repair, neutralizes inflammation and provides pain relief at injured tissue areas through the biostimulation of cellular events (8).

Our group has been exploring the biological mechanisms underlying the inflammatory process of paracoccidioidomycotic lesions treated by HeNe laser. Previously, using an experimental model of PCM we showed that laser-treated mice presented reduction in footpad edema, faster cutaneous wound healing, confluent granulomas, diffuse and more loosely distributed immunolabeling for tumor necrosis factor- α (TNF- α), and enhanced labeling of γ -interferon (IFN- γ) (9). After this, in a more in-depth investigation, we showed alterations in lesion microenvironment such as the reduction in the IFN-inducible protein 10 (also known as CXCL-10) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) expression, an increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and a decrease in reticulin fiber deposition (10). Conjointly, our results suggested that HeNe changes the expression of these molecules which causes the reduction in the inflammatory response and the increase in angiogenesis coupled with the promotion of healing.

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author email: verinaud@unicamp.br (Liana Verinaud)

© 2010 The Authors. Journal Compilation. The American Society of Photobiology 0031-8655/10

In this work, by using the same experimental model of paracoccidioidomycotic lesions treated by HeNe laser, we analyzed alterations in the expression of other important molecules involved in the complex and dynamic process of regenerating dermal and epidermal tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Specific pathogen-free BALB/c male mice, 6–8 weeks old, obtained from Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) were used. Animals were maintained in transparent acrylic plastic isolators under aseptic conditions throughout the study. Sterile water and feed were provided *ad libitum*. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (COBEA) and approved by the animal care and use committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

Fungus. The virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis* was used in this study. It was maintained at 37°C in its yeast phase in Fava Netto's medium and used at the seventh day of cell culture growth.

Infection of mice. *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts from 7-day-old cultures were collected. The fungal mass was suspended in PBS, mixed twice for 10 s on a Vortex-mixer, centrifuged and double-washed in PBS. The concentration was adjusted to 1×10^6 mL⁻¹ yeast cells based on hemocytometer counts. Viability was determined by Lactophenol cotton blue staining (11) and was higher than 90%. Twelve mice received 5×10^6 yeast forms of *P. brasiliensis* contained in 50 μ L buffer into the left back footpad, followed immediately by 50 μ L sterile saline into the opposite one. Animals were monitored daily for the progression of lesions which peaked at 7 days after inoculation.

Laser treatment. Seven days after *P. brasiliensis* infection, the lesions were clinically homogeneous and the animals were separated into two groups of six mice each (experimental group and control group). On days 7, 8 and 9 following infection, the lesions of mice from the experimental group were irradiated with laser. The control group underwent the same handling, but was sham-irradiated. The laser used in this study was a HeNe laser with a measured output of 5 mW, which emits light in a collimated beam (diameter 4 mm) with a wavelength of 632.8 nm. The irradiating flux for each treatment (previously determined by dose–response studies) was 3.0 J cm⁻² with a stimulation time of 75 s and without anesthesia or sedation. The laser probe was applied punctually, in contact with the wound. The calculation formula for treatment was $D = P_m \times t/A$, where D is the treatment dose, P_m is the medial output, t is the exposure time and A is the beam area. On day 10 after infection all animals were killed by CO₂ inhalation and the footpads removed for analysis.

Immunofluorescence for extracellular matrix elements. Feet were collected and fixed in a 2% paraformaldehyde solution for 12 h at room temperature. The specimens were submitted to diafanization with xylene, dehydrated by graded ethanol, embedded in paraffin and cut in 5- μ m-thick sections. Samples were incubated with antifibrinectin or antilaminin as the primary antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 1 h at room temperature, washed three times with PBS and then labeled with a fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Samples were analyzed by fluorescence microscopy (Olympus) and the images obtained were subsequently quantified for the presence of extracellular matrix (ECM) proteins using the Image J software (12).

Gene expression of cytokines and chemokines. The expression of cytokines and chemokine genes was evaluated by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). RNA was extracted from lesions using the Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Amersham, UK). After RNA quantification and analysis of RNA integrity on a 1.5% agarose gel, reverse transcription was performed with approximately 2 μ g of RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was quantified in a Nanodrop spectrophotometer by determining the absorbance at 260 nm, and the 260/280 nm absorbance ratio was calculated. The PCR was performed with an ABI Prism 7300 device (Applied Biosystems) and the reactions were carried out in 25 μ L volume and in the presence of the TaqMan PCR Master MixTM (Applied Biosystems), using different sets of oligonucleotides and probes for the amplification of the following messenger RNA: 18S (endogenous

control), interleukin (IL)-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, transforming growth factor-beta (TGF- β), CCL3, CCL5 and CXCL10 genes. These corresponded respectively to the following reference numbers (Applied Biosystems): Hs99999901_s1, Mm00439619_m1, Mm00801778_m1, Mm00443258_m1, Mm00439616_m1, Rn01475964_m1, Mm00441259_g1, Mm01302427_m1 and Mm99999072_m1. Data are presented as relative mRNA levels calculated by the equation $2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_t$ of target gene minus C_t of 18S) (13).

Statistical analysis. The Mann–Whitney test was used for statistical evaluation of the results comparing laser-treated and nontreated mice. Results are given as mean values (\pm SE) and P -values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Based on the known importance of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines during the wound healing process, these molecules were evaluated in lesions from *P. brasiliensis*-infected animals treated with HeNe laser, as well as the nontreated group.

Interleukin-17, a pro-inflammatory cytokine produced mainly by activated T-cells, is a potent inducer of various cytokines such as TNF. TNF- α , a prototypic member of a cytokine family that regulates essential biological functions (e.g. cell differentiation, proliferation, survival, apoptosis) and a broad spectrum of responses to stress and injury, is primarily produced by immune cells such as monocytes and macrophages. It is a potent chemoattractant for neutrophils and a strong activator of phagocytosis in macrophages. Another pro-inflammatory cytokine, IFN- γ , produced predominantly by natural killer, natural killer T cells, and CD4 and CD8 T lymphocytes, has been characterized as having a multitude of effects *in vivo*. However, the most striking effect that IFN- γ exerts is the enhancement of microbicidal activity by macrophages and other phagocytes *in vitro*.

During the investigated period, IL-17 and TNF- α mRNA expression was down-regulated ($P \leq 0.05$) in lesions exposed to HeNe laser irradiation. IFN- γ mRNA, however, showed no significant difference from the nontreated group (Fig. 1).

Anti-inflammatory cytokines have also been shown to be important regulators of wound repair. IL-10, for example, has been implicated as key regulator of the wound healing process as it inhibits the infiltration of neutrophils and macrophages toward the site of injury as well as the expression of several pro-inflammatory cytokines and chemokines. Also, the TGF- β superfamily is a structurally related group of proteins with a crucial role at the wound site. Several studies have demonstrated a rapid induction of TGF- β 1 and TGF- β 2 in wounds, whereas an increase in TGF- β 3 expression is seen at later stages of repair. In the healing wound, TGF- β is produced by leukocytes, macrophages, fibroblasts and keratinocytes, and acts on these cells mainly to stimulate angiogenesis, fibroblast proliferation and ECM deposition.

In our experimental model, IL-10 mRNA expression showed a decrease in laser-treated lesions ($P \leq 0.05$). However, the mRNA expression for TGF- β showed no significant difference when compared with the control group (Fig. 2).

Chemokines play an important role in the recruitment of inflammatory cells to the wound site. In addition, the presence of chemokine receptors on resident cells suggests that chemokines also contribute to the regulation of re-epithelialization, tissue remodeling and angiogenesis. To further investigate changes in chemokine production, we analyzed the relative

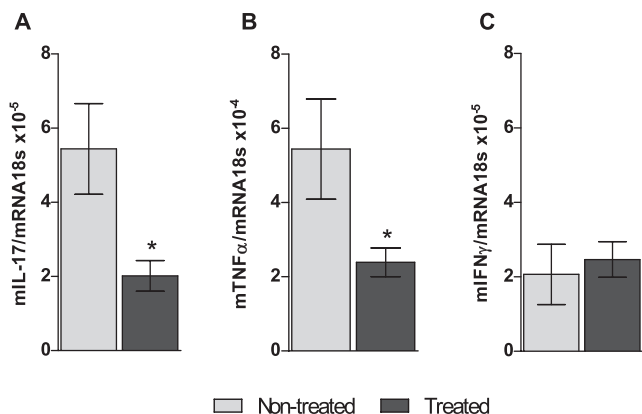


Figure 1. Relative gene expression of pro-inflammatory cytokines in lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals treated with HeNe laser, as well as the nontreated group. (A, B) Significantly decreased levels of IL-17 and TNF- α were observed in treated lesions. (C) No alteration could be observed in the relative expression of IFN- γ among treated and nontreated lesions. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $P \leq 0.05$.

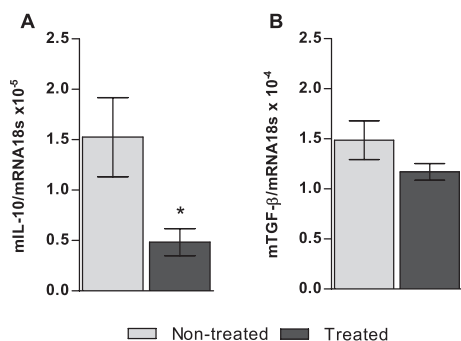


Figure 2. Relative gene expression of anti-inflammatory cytokines in lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals treated with HeNe laser, as well as the nontreated group. (A) Decreased levels of IL-10 were observed in laser-treated lesions. (B) No alteration was observed in the relative expression of TGF- β . Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $P \leq 0.05$.

gene expression of CCL3, CCL5 and CXCL10 in lesions from laser-treated and nontreated animals. The analysis of CCL3 and CXCL10 mRNA expression showed decreased levels in laser-treated lesions ($P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively) when compared with nontreated ones (Fig. 3A,B). However, no significant difference was observed in relation to CCL5 mRNA expression (Fig. 3C).

Possible differences in ECM deposition in laser-treated and nontreated lesions were also analyzed.

As ascertained by immunofluorescence, we detected decreased density of fibronectin and laminin in HeNe laser-treated lesions ($P < 0.05$) when compared with the nontreated group (Fig. 4A,B). These results were quantitatively confirmed by histometric computer-based analyses (Fig. 4C,D).

DISCUSSION

Wound healing is a complex process that involves a series of events including inflammation, chemotaxis, granulation tissue formation, angiogenesis, epithelialization, collagen synthesis and tissue remodeling. Cytokines and chemokines play a very important role in granulation tissue formation by the activa-

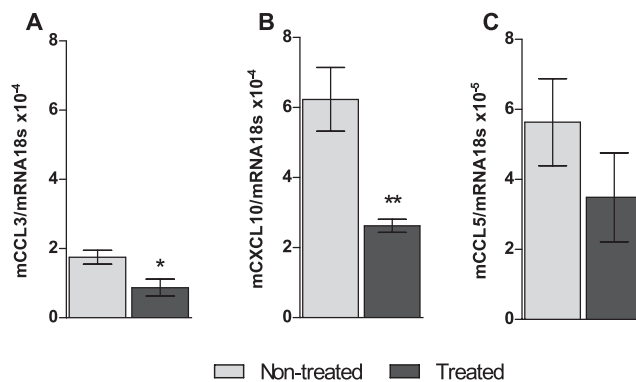


Figure 3. Relative gene expression of chemokines in lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals treated with HeNe laser, as well as the nontreated group. (A, B) Decreased levels of CCL3 and CXCL10, respectively, in laser-treated lesions. (C) No significant alteration was observed in the relative expression of CCL5 among treated and nontreated lesions. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

tion and recruitment of leukocytes. The ECM elements also take place in the migration of cells-related events, mainly in re-epithelialization process.

TGF- β , platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, TGF- α , VEGF, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor, angiopoietin, endothelin, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-2 and IFN- α/β are considered the most important cytokines, growth factors and chemokines involved in skin repair (14). Previously, using our model, we demonstrated that HeNe laser treatment not only enhances wound healing but also decreases IFN- γ and increases VEGF labeling. Furthermore, the treatment modulated collagen (Type 4 and 3) deposition and drop in TNF- α labeling (9,10).

In general, the therapeutic action of laser energy on the skin is based on the unique properties of laser light that may be absorbed, reflected, transmitted or scattered, and of the complexity of laser-tissue interactions (15–18). Actually, there are many speculations and theories about the biological mechanisms associated with the HeNe laser which participates in the therapeutic action in wound healing. Despite this, the real events remain unclear.

In vitro research has shown that low energy lasers can induce biostimulatory effects in macrophages increasing the growth factor production for fibroblasts, which are essential for the production of collagen and other ECM elements (19).

Here, we have demonstrated the biological effects of the HeNe laser on important elements involved in the inflammatory process. The decrease in relative gene expression of IL-17 and TNF- α observed in HeNe laser-treated lesions and the absence of changes in the relative gene expression of IFN- γ and TGF- β , among laser-treated and nontreated groups, can be associated with the fast wound repair promoted by laser, as the cytokines, mainly pro-inflammatory, are essential for the granulation tissue formation, although their overexpression may produce local tissue injury and delay wound healing.

In accordance with our data, the decreasing expression of the chemokines CXCL10 and CCL3 in laser-treated lesions also favors the theory that the HeNe laser may be an efficient tool in healing wounds caused by *P. brasiliensis*. The role of

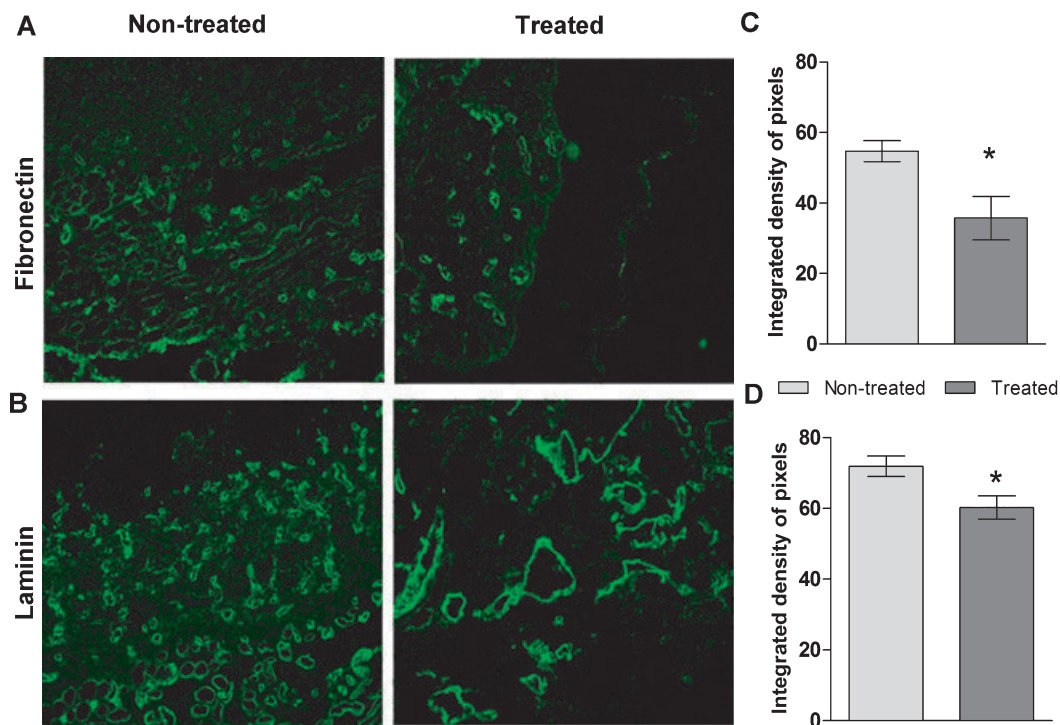


Figure 4. Extracellular matrix density in lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals treated or not with HeNe laser. (A) Immunofluorescence staining shows decreased density of fibronectin in laser-treated lesions when compared with nontreated ones. (B) Decreased density of laminin is also observed in treated laser lesions (original magnification, $\times 100$). (C, D) The graphics correspond to quantitative analysis of selected microscopic fields of lesions from laser-treated and nontreated lesions in terms of fibronectin and laminin, respectively. Results are expressed in pixels mm^{-2} and represent the mean \pm SE for at least five animals. * $P \leq 0.05$.

such chemokines is related to the recruitment of neutrophils, lymphocytes and monocytes. Tissue damage is closely associated with acute inflammation and the entrance of neutrophils, which constitute nearly 50% of all cells in the wound site at the first day after tissue injury (20). The overexpression of CXCL10 was related to a more intense inflammatory response associated with the recruitment of lymphocytes (20,21), delaying re-epithelialization and prolonging the granulation phase. CCL3, on the other hand, mediates macrophage recruitment and its presence precedes and coincides with the maximal infiltration of these inflammatory cells, characterizing a strong inflammatory response that impaired wound healing repair (22,23).

Extracellular matrix elements such as laminin and fibronectin are strong integrin ligands, which offer substrate for cell adhesion and are essential to wound repair. Thus, laminin is present in skin basement membrane and it seems clear that the re-epithelialization phase of wound healing benefits particularly from a laminin-rich basement membrane (24).

Interestingly, our data on fibronectin and laminin deposition, which presented a decrease in laser-treated mice, can be associated with a final process of wound healing characterized by a normal tissue appearance without excess of ECM elements, as the enhanced deposition of ECM is associated with fibrosis.

In conclusion, our data, altogether, offer new advances for a comprehensive knowledge about the HeNe laser therapy on skin wounds. We suggest that laser action is associated with particular photochemical and photomechanical properties that are capable of stimulating specific biological factors that are essential for fast tissue repair. Obviously, the inflamma-

tory events have a specific dynamic time respecting healing phases with or without using the laser. However, laser therapy may modulate the intensity of these factors involved in each step. The decrement in inflammatory cytokines and chemokines and the increment in fibronectin and laminin provide strong evidence of such laser modulation redounding in benefits for wound healing. On the other hand, as already pointed out by us, the HeNe laser also presents fungistatic and/or fungicidal activity as fungi that were harvested from laser-treated animals presented no capability of growth *in vitro* compared with those obtained from nontreated mice (9). Besides, experiments conducted by our laboratory have demonstrated that fungal cultures treated with different doses of irradiation and then evaluated for viability showed no capability of growth (L. Verinaud, unpublished data). It has yet to be answered, however, whether the HeNe laser modifies, or even destroys, fungal structures that are used by the pathogen as resistance mechanisms. Certainly, this fungistatic/fungicidal activity of the laser also plays an important role in accelerating the wound healing process and must be taken into consideration.

It seems reasonable to suppose that the HeNe laser therapy may promote benefits for the patients suffering with lesions that are severe, painful and difficult to be cured by currently available antimycotics like those caused by *P. brasiliensis*.

Acknowledgements—The authors acknowledge financial support by the state-granting agency (FAPESP/05/55234-0) and by the National Research Council (CNPq/470436/2006-9). We are indebted to Professor Maria Alice da Cruz Höfling for her important collaboration with the fluorescence microscopy (FAPESP 05/53625-1).

REFERENCES

- Borges-Walmsley, M. I., D. Chen, X. Shu and A. R. Walmsley (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* **10**, 80–87.
- Restrepo, A. (2000) Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: Implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med. Mycol.* **38**, 317–322.
- Lupi, O., S. K. Tyring and M. R. McGinnis (2005) Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 931–951.
- Trent, J. T. and R. S. Kirsner (2003) Identifying and treating mycotic skin infections. *Adv. Skin Wound Care* **16**, 122–129.
- Jovanovic, L., B. Mirkovic and B. Zivkovic (1998) Soft laser in the therapy of herpes simplex labialis. *Facta Universitatis* **5**, 61–63.
- Yu, H., K. L. Chang, C. L. Yu, J. W. V. Chen and G. S. Chen (2003) Helium neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 56–64.
- Qadri, T., L. Miranda, J. Tunér and A. Gustafsson (2005) The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* **32**, 714–719.
- Karu, T. (1989) Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* **56**, 691–704.
- Ferreira, M. C., V. N. Brito, J. Gameiro, M. R. Costa, E. C. Vasconcellos, M. A. Cruz-Hofling and L. Verinaud (2006) Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **84**, 141–149.
- Ferreira, M. C., J. Gameiro, P. R. A. Nagib, V. N. Brito, E. C. Vasconcellos and L. Verinaud (2009) Effect of low intensity helium–neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. *Photochem. Photobiol.* **85**, 227–233.
- Sano, A., K. Nobuyuki and K. Iabuki (1993) A comparative study of four different staining methods for stimulation of live yeast of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathology* **124**, 157–161.
- Collins, T. J. (2007) ImageJ for microscopy. *BioTechniques* **43**, 25–30.
- Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon and C. Mathieu (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J. Biomol. Tech.* **14**, 33–43.
- Singer, A. J. and R. A. Clark (1999) Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **341**, 738–746.
- Anderson, R. R. and J. A. Parrish (2003) The optics of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **77**, 13–19.
- Hruza, G. J., R. G. Geronemus, J. S. Dover and K. A. Arndt (1993) Lasers in dermatology. *Arch. Dermatol.* **129**, 1026–1035.
- Anderson, R. R. (1997) Laser–tissue interactions in dermatology. In *Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery* (Edited by K. A. Arndt, J. S. Dover and S. M. Olbricht), pp. 25–51. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Stratigos, A. J. and J. S. Dover (2000) Overview of lasers and their properties. *Dermatol. Ther.* **13**, 2–16.
- Dube, A., H. Bansal and P. K. Gupta (2003) Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**(8), 851–855.
- Posten, W., D. A. Wrone, J. S. Dover, K. A. Arndt, S. Silapunt and M. Alam (2005) Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. *Dermatol. Surg.* **31**(3), 334–340.
- Engelhardt, E., A. Toksoy, M. Goebeler, S. Debus, E. B. Brocker and R. Gillitzer (1998) Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am. J. Pathol.* **153**, 1849–1860.
- Christopherson, K. and R. Hromas (2001) Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* **19**, 388–396.
- Dipietro, L. A., M. G. Reintjes, Q. E. Low, B. Levi and R. L. Gamelli (2001) Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1. *Wound Repair Regen.* **9**, 28–33.
- Yi, J. Y., Y. H. Yoon, H. S. Park, C. H. Kim, H. J. Kang, E. Lee and Y. Y. Kim (2001) Reconstruction of basement membrane in skin equivalent; role of laminin-1. *Arch. Dermatol. Res.* **293**, 356–362.

Artigo: **Effect of Helium-Neon (HeNe) laser irradiation on lesions in experimental paracoccidioidomycosis.** Submetido para Photochemistry and Photobiology.

Effect of Helium-Neon (HeNe) *laser* irradiation on lesions in experimental paracoccidioidomycosis

Thiago Alves da Costa¹, Carolina Francelin¹, Rosária Di Gangi¹, Maria Renata Sales Nogueira Costa², Rodolfo Thomé¹; Luciana Campos Paulino³; & Liana Verinaud^{1*}

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil; ²Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, São Paulo, Brazil; ³Natural and Human Sciences, Federal University of ABC - UFABC, São Paulo, Brazil;

* Corresponding author.

Mailing address: Departamento de Biologia Estrutural e Funcional. Instituto de Biologia – UNICAMP. Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n. CEP: 13084-970. Campinas – São Paulo – Brasil.

E-mail: verinaud@unicamp.br

ABSTRACT

The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of Paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Latin America. The infection is known to take place firstly in the lungs and then to disseminate to other organs and tissues, including the skin. Cutaneous lesions are extremely painful, sensitive and are difficult to be cured by currently available antimycotics because of the multidrug resistance that some *P. brasiliensis* isolates present. From this perspective, the helium-neon (HeNe) *laser* emerges as an excellent alternative treatment since its microbicidal action and wound healing properties are already well known. Our group has been exploring the biological mechanisms underlying the inflammatory process of paracoccidioidomycotic lesions treated by HeNe *laser* on cutaneous lesions caused by the inoculation of yeast cells into the back foot-pad of Balb/c mice. In this work we showed that *laser*-treated mice presented reduction of footpad edema, greater histologic organization, milder inflammatory infiltrate, higher organization of the granulation tissue around the lesion, and enhanced immunolabeling of iNOS. In addition the SOD activity and NO production were increased. Also, a higher percentage of macrophages, in detriment of lower neutrophil numbers, were observed throughout the treatment. The percentage of NK and NKT cells were slightly higher after the first *laser* session. Altogether these results point towards a dual effect of the treatment, decreasing the inflammatory response and accelerating the healing of the lesions. We believe that HeNe *laser* is a new non-harmful strategy that may be used as an adjuvant tool to be combined with anti-fungal agents for improving the treatment of PCM lesions.

Key words: Low-Level *Laser* Therapy; HeNe *laser*; paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*

INTRODUCTION

The thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is the etiological agent of the most important systemic mycosis in Latin America, the Paracoccidioidomycosis (PCM) (1). The lungs are the first place of infection because of the inhalation of infecting propagules, and their subsequent dissemination occur via bloodstream and/or lymphatic routes affecting other organs (2, 3, 4, 5). The skin and mucous membranes may be also affected by infection, which induces extremely painful and sensitive lesions where the fungi can remain active for months even after the beginning of treatment with anti-fungal drugs. Furthermore, these lesions can progress to ulcerative wounds with damage to epithelial cells with predisposition towards secondary bacterial infection (6, 7).

The conventional treatment for cutaneous lesions in PCM is based on anti-fungal drugs that are frequently toxic at therapeutic dosages and induce side effects in patients. This is a long-term treatment and its efficacy has been questioned (8). In general, the patients who present wounds still suffer with the discomfort for a long time. However, new advances on complementary and alternative treatments are being developed and a promising candidate is the low-level *laser* therapy (LLLT) which could facilitate and maximize patient healing without toxic effects (9).

In this perspective, the helium-neon (HeNe) *laser* may emerge as a novel therapy form due its microbicidal activity and its ability to heal wounds without changing cell function (10, 11). The exact mechanism of LLLT remains unclear, but it is known that it speeds and improves the quality and tensile strength of tissue repair, neutralizes inflammation, and provides pain relief at injured tissue areas through the biostimulation of cellular events (12, 13).

Our group has been exploring the biological mechanisms underlying the inflammatory process of paracoccidioidomycotic lesions treated by HeNe *laser* on cutaneous lesions caused by the inoculation of yeast cells into the back foot-pad of Balb/c mice.

Our results showed that *laser*-treated mice presented reduction in footpad edema, faster cutaneous wound healing, confluent granulomas, diffuse and more loosely-distributed immunolabeling for tumor necrosis factor-alfa (TNF- α), and enhanced labeling of interferon-gamma (IFN- γ) (14). After this, in a more in-depth investigation, we showed alterations in lesion microenvironment such as the reduction in the inducible protein 10 (also known as CXCL-10) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) expression, an increase of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, and a decrease of reticulin fiber deposition (15). More recently, we have observed decreased levels of pro-inflammatory IL-17 and TNF- α , and of anti-inflammatory IL-10 cytokines in lesions exposed to HeNe *laser* irradiation. Chemokines CCL3 and CXCL10 showed decreased levels in *laser* treated lesions, but no significant difference was observed in relation to the CCL5 expression. We also detected decreased density of fibronectin and laminin in HeNe *laser* treated lesions (16).

Altogether these results point towards a dual effect of the treatment, decreasing the inflammatory response and accelerating the healing of the lesions.

In this work, by using the same experimental model of paracoccidioidomycotic lesions treated by HeNe *laser*, we analyzed some immune modulatory effects occurring early on the next day after the action of HeNe *laser* on the healing of paracoccidioidomycotic injuries.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Specific pathogen free BALB/c male mice, 6-8 week-old, obtained from Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) were used. Animals were maintained in transparent acrylic plastic isolators under aseptic conditions throughout the study. Sterile water and feed were provided *ad libitum*. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (SBCAL) and approved by the animal care and use committee of the University of Campinas (protocol 1944-1).

Fungus

The virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis* was used in this study. It was maintained at 37°C in its yeast phase in Fava Netto's medium and used at the 7th day of cells culture growth.

Infection of mice

P. brasiliensis yeasts from 7 day-old cultures were collected. The fungal mass was suspended in phosphate-buffered saline (PBS), mixed twice for 10 s on a Vortex-mixer, centrifuged and double-washed in PBS. The concentration was adjusted to 1×10^8 /mL yeast cells based on

hemocytometer counts. Viability was determined by Lactophenol cotton blue staining (17) and was higher than 90%. Thirty mice received 5×10^6 yeast forms of *P. brasiliensis* contained in 50 μ l buffer into the left back footpad, followed immediately by 50 μ l sterile saline into the opposite one. Animals were monitored daily for the progression of lesions, which peaked at 7 days after inoculation.

Laser treatment

Seven days after *P. brasiliensis* infection, the lesions were clinically homogeneous and the animals were separated into twelve sets of five mice each (six sets in the experimental group and six sets in the control group). On days 7, 8 and 9 following infection, the lesions of mice from the experimental group were irradiated with *laser* (referred as T1, T2 and T3, respectively). The control group underwent the same handling, but was sham-irradiated (referred as non-treated animals). The *laser* used in this study was a helium-neon *laser* with a measured output of 3,5mW, which emits light in a collimated beam (diameter 4mm) with a wavelength of 632.8 nm. The irradiating flux for each treatment (previously determined by dose response studies) was 3.0 J/cm² with a stimulation time of 110 seconds. The *laser* probe was applied punctually, in contact with the wound, without anesthesia or sedation. The calculation formula for treatment was $D = Pm \times t/A$, where D is the treatment dose, Pm is the medial output, t is the exposure time, and A is the beam area. Twenty-four hours after each treatment, five animals from each group were killed by CO₂ inhalation and the footpads removed for analysis.

Histopathological analysis

For microscopic histological evaluation, footpads were collected and fixed in 4% paraformaldehyde solution for 16 hours at 4°C. The specimens were submitted to diafanization with xylene, dehydrated by graded ethanol, embedded in paraffin and cut in 5- μ m-thick sections. Histologic changes were evaluated on sections stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Flow cytometry analysis of cell populations in paracoccidioidomycotic lesions

After sacrifice, the footpads from *laser*-treated and non-treated animals were removed, soaked and mashed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% fetal calf serum. The solution obtained passed by a cell strainer with mesh pore size of 100 μ m (BD, San Diego, California, USA) and was then centrifuged at 1000g for 15 minutes at 4°C for subsequent cellularity evaluation. The red cells were removed by using ammonium chloride lysis buffer (0.16 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.001 M EDTA, pH 7.4). Multi-color flow cytometric phenotypic analysis was performed with a Gallios device (Beckman Coulter) using fluorescent isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC) as fluorescent dyes. Directly conjugated anti-mouse monoclonal antibodies were used: CD3, CD11b, Ly6G/6C (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), CD11b and NK1.1 (eBioscience, San Diego, CA, USA). For macrophages detection anti-mouse F4/80-like receptor was used with Mouse BD Fc Block™ purified anti-mouse CD16/CD32 mAb 2.4G2, the staining was amplified by using a biotinylated anti-rat IgG2a mAb RG7/1.30 second-step antibody followed by a "bright" third-step reagent, Streptavidin-APC (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). Fluorochrome-labelled isotype-matched negative controls for the specific monoclonal antibodies were also obtained from Pharmingen.

The assessment of neutrophil population was performed using the subtraction of macrophages population from CD11b and Ly6G and Ly6c positive cells. Cells were stained for 20 min and then washed with PBS, fixed with paraformaldehyde 4% and analyzed by flow cytometry in a Gallios device (Beckman Coulter). Analyses were performed after recording 10.000 events for each sample using Flow Jo 7.6.5 (Ashland, OR, USA).

Immunohistochemical analysis

The production of iNOS by macrophages in *laser*-treated and non-treated lesions was done by using immunohistochemical method. The footpad sections were deparaffinized with xylene, hydrated in an ethanol gradient and water before stain reaction. Directly after, incubation was performed with 3% H₂O₂ in absolute methanol (v/v) to block endogenous peroxidase activity (10min). From here all procedures were done according with ImmunoCruz™ rabbit ABC Staining System (sc-2018) datasheet. Briefly, all sections were incubated with goat serum to avoid secondary antibody nonspecific binding for one hour at 4°C and then incubated with specific primary antibodies to mouse iNOS both from AbCam (Cambridge, Cambridgeshire, UK) for 16 hours at 4°C. After washing, sections were overlaid for 1h with the secondary antibody biotin-conjugated. This was followed by incubation with AB enzyme reagent to amplification of signal reaction. Bound antibodies was detected by reactivity with 3,3'-diaminobenzidine plus H₂O₂. After tap washing, the slides were counterstained by Harris Haematoxilin and mounted with Permount. For immunohistochemical controls primary antibodies were omitted from the staining procedure and were negative for any reactivity.

Quantification of the immunostaining (integrated density of pixels/area) was done by using the Image J software (18).

Assessment of tissue nitric oxide (NO) concentration and sUPEROXIDE dismutase (SOD) activity

After sacrifice, the footpads from *laser*-treated and non-treated animals were removed, soaked and mashed in phosphate-buffered saline (PBS). The solution obtained was filtered with a syringe filter of 0.22 μm and then centrifuged at 1000g for 15 minutes at 4°C. The SOD activity in the supernatant was measured using the SOD Assay Kit-WST (Sigma-Aldrich, USA) and standardized with SOD from bovine erythrocytes (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Nitrate (NO_3^-) + nitrite (NO_2^-) were measured in the supernatant using the Cayman Chemical Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). This assay converts NO_3^- to NO_2^- with nitrate reductase, and total NO is measured as total nitrite using the Griess reagent.

Statistical Analysis

Mann Whitney test was used for statistical evaluation **of** the results comparing *laser* treated and non-treated mice. Results are given as mean values (\pm SE) and *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Histopathological analysis

The paracoccidioidomycotic lesions obtained from non-treated animals had the same pattern at the 8, 9 and 10 days post infection, showing a disorganized epidermis and superficial dermis with an intensive mixed inflammatory infiltrate where some fungi can be seen (Figure 1A). At the center of the lesion, a substantial necrotic center with draining of fibrinous exudate, cellular debris and viable fungi was visible (Figure 1B). The animals that were treated with one session of *laser* irradiation (T1) showed the same morphological pattern observed with the untreated specimens, but with hyalinization of the collagen fibers on the connective tissue and lack of vacuolated macrophages against a larger area of granulomatous inflammation (data not shown). In mice treated with two sessions of *laser* irradiation (T2) the epidermis and superficial dermis showed greater histologic organization, milder mononuclear infiltrate and a light increase in collagen deposition (Figure 1C). At the center of the lesion, there was still a substantial necrotic center, but less viable fungi and a mixed inflammatory infiltrate are seen (Figure 1D). After three *laser* sessions (T3), the dermis presented a normal histological appearance with an intense collagen deposition (Figure 1E). At this time, the lesions also presented a higher organization of the granulation tissue pointing to the encapsulation of the lesion (Figure 1F).

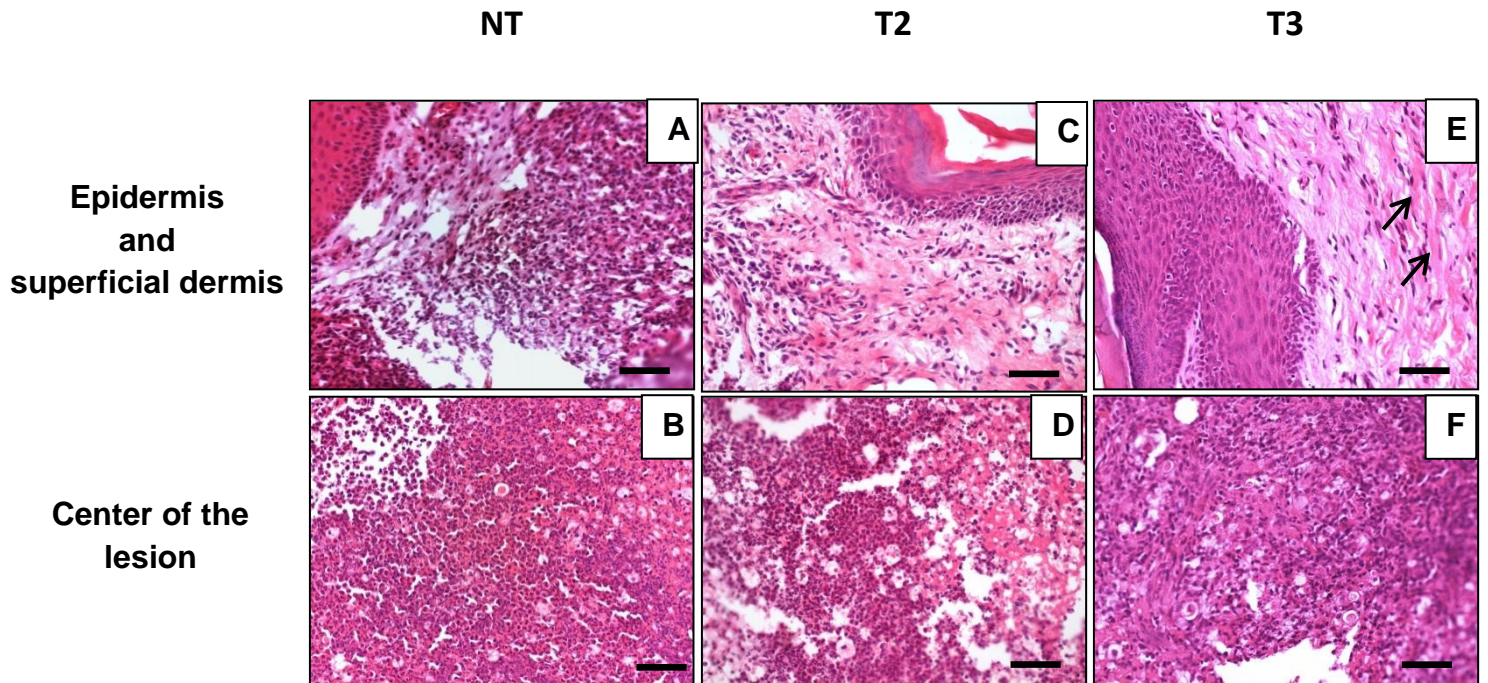


Figure 1: Histopathological features of PCM lesions. A and B: non laser-treated animal (NT); C and D: animals treated with 2 laser sessions (T2); E and F: animals treated with 3 laser sessions (T3). Note that NT animal shows a disorganized aspect of the epidermis and superficial dermis with an intense mixed inflammatory infiltrate (A), and high numbers of viable yeast cells at the center of the lesion (B). On the other hand, T2 lesion shows a milder mononuclear infiltrate (C), although viable yeast cells are still present in the center of the lesion (D). After three laser sessions (T3), the lesion presents a normal histologic appearance (E) with an increase in collagen deposition (arrow), and few yeast cells (F). The figures are representative of at least three experiments performed on different experimental days. Bar: 50 μ m.

Flow cytometry

Cell populations present in the experimental PCM footpad lesions were analyzed by flow cytometry (Figure 2).

The analysis of lymphocyte subsets revealed a significant increase in the percentage of cells expressing NK and NKT cells associated markers soon after the first day of treatment (T1).

After two (T2) and three *laser* sessions (T3), a gradual reduction of these subpopulations was observed in the lesions and the same cell percentage in *laser* treated and non-treated animals at days 9 and 10 post infection was found (Figure 2A).

The analysis of the total phagocytes population showed that these cells correspond to more than 80% of the total cells present in the lesion, and no significant differences between *laser* treated and non-treated groups could be demonstrated (data not shown). However, the percentage of macrophages was higher, while the percentage of neutrophils was significantly lower, in *laser*-treated animals than in the non-treated controls (Figure 2B).

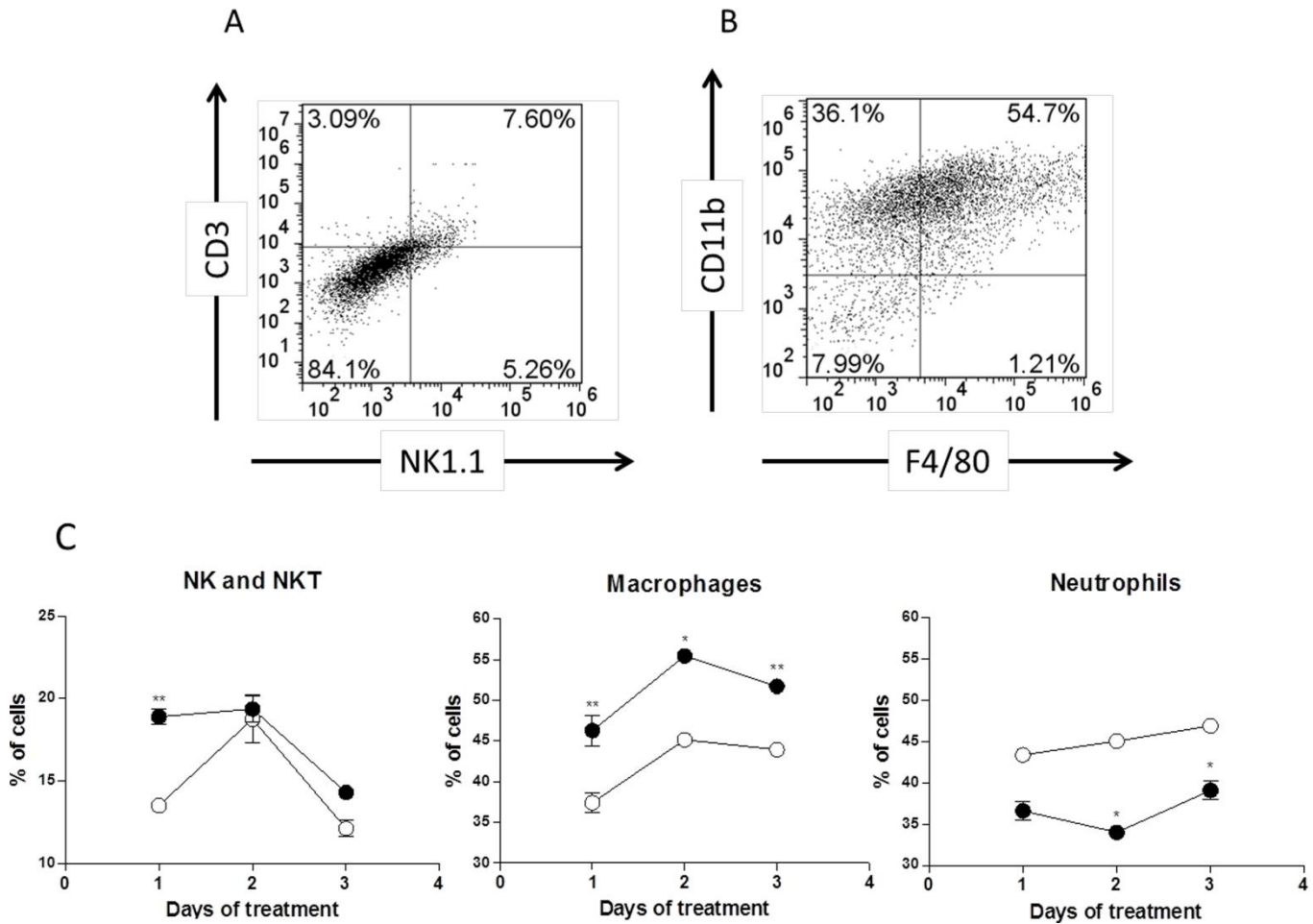


Figure 2: Analysis of cells at the experimental PCM lesion. A and B: representative dot-plot for NK and NKT cell subsets, and for macrophage and neutrophil populations, respectively. C: percentage of cells in lesions from non-treated (○) and laser treated animals (●). Note that after one laser session, the percentage of NK and NKT subsets are higher than the non-treated group. Also, a highest percentage of macrophages and a lowest percentage of neutrophils could be detected on treated animals throughout the treatment. Results are expressed as mean ± standard error (SE) for at least five animals. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Immunohistochemistry

The analysis of iNOS production, by the immunohistochemistry technique, revealed an increased expression in *laser* treated animals when compared to non-treated ones (Figures 3A to 3D). While non-treated animals showed weak labeling for iNOS (Figure 3A), *laser* treated animals presented strong labeling for this molecule after one (T1), two (T2) or three treatments (T3) (Figures 3B, 3C and 3D, respectively). These results were quantitatively confirmed by histometric computer-based analyses (Figure 3E).

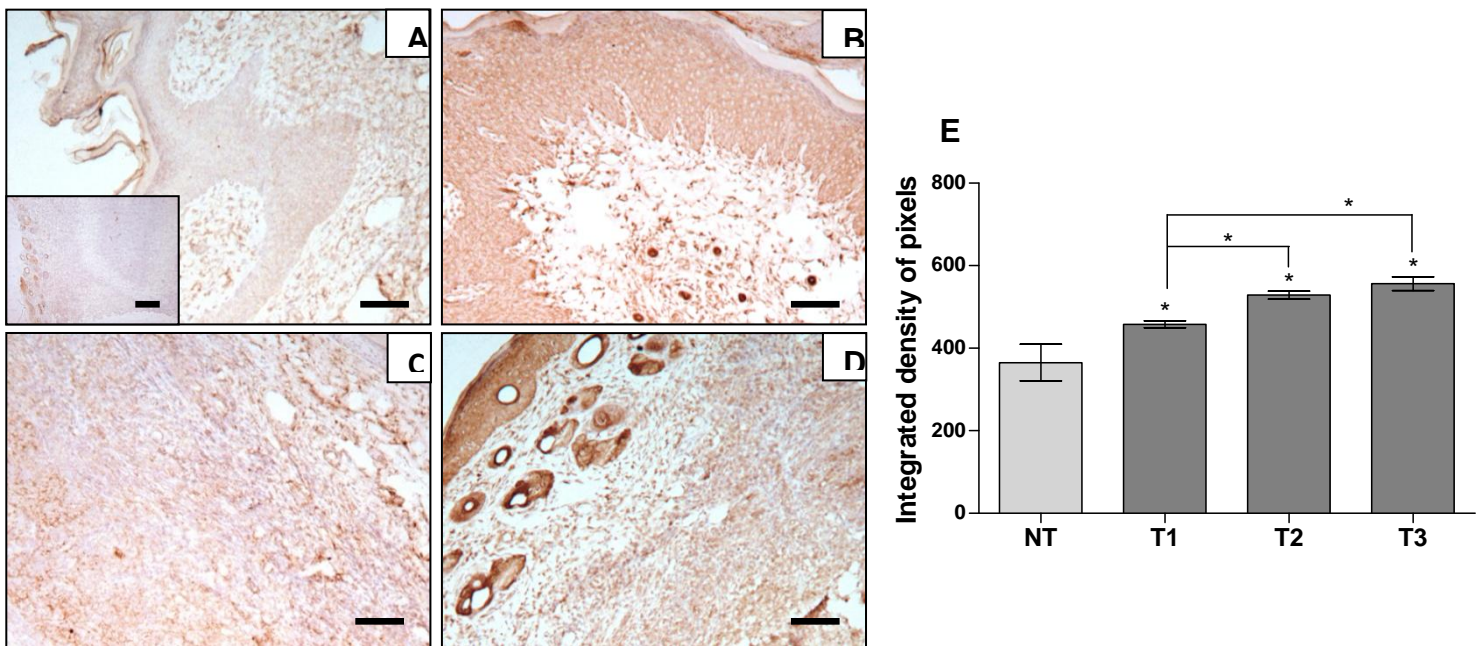


Figure 3: Immunohistochemistry staining for iNOS. A: Non-treated animals (NT); B to D: animals treated with one (T1), two (T2) or three (T3) laser irradiation session, respectively. Insert: control staining, incubation with non-immune serum. The figures are representative of at least three experiments performed on different experimental days. Bars: 250 μm (insert) and 100 μm. E: The graphic corresponds to quantitative analysis of selected microscopic fields of lesions from laser-treated and non-treated lesions in terms of iNOS. Results are expressed in total pixels and represent the mean ± SE for at least five animals. * $p < 0.05$.

Superoxide dismutase (SOD) activity and nitric oxide (NO) concentration

The *laser* treatment of the PCM lesions leads to dramatic changes in the superoxide dismutase activity and nitric oxide production when compared to the non-treated group.

The nitric oxide concentration also significantly increased after two sessions of *laser* irradiation (T2). After the third day of treatment (T3), however, tissue NO concentration was diminished, remaining considerably lower than the non-treated group (Figure 4, left panel).

The SOD activity showed a significant increase after two *laser* irradiation sessions (T2). After three *laser* irradiation sessions (T3) this enzyme activity was reduced, but it remained significantly higher than the non-treated animals (Figure 4, right panel).

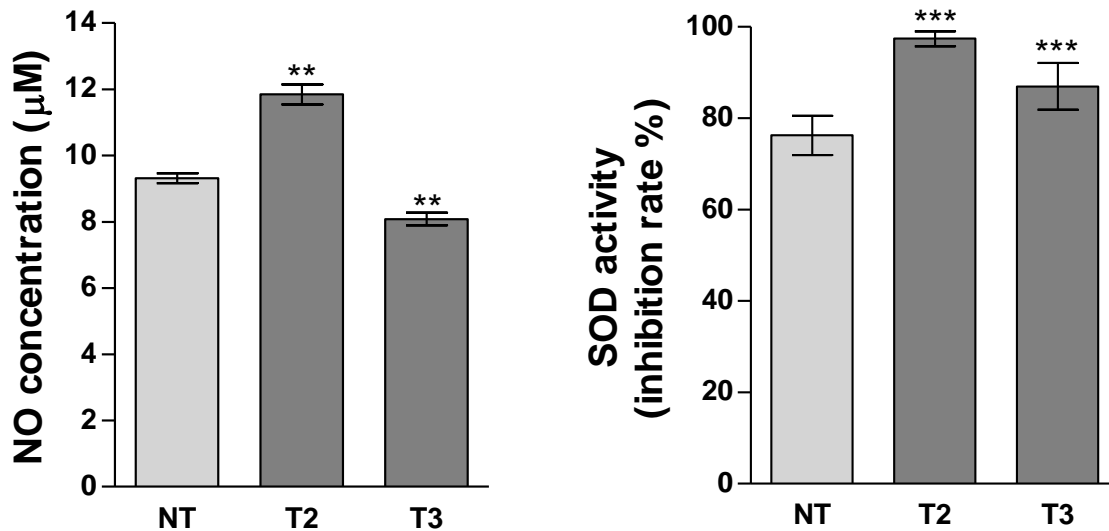


Figure 4: Tissue nitric oxide (NO) concentration and superoxide dismutase (SOD) activity in non-treated (NT) mice and after two (T2) or three (T3) laser treatment. Both, SOD activity and NO concentration were significantly increased in lesions treated for 2 days with HeNe laser (T2). However, SOD activity remained significantly higher after three days of treatment (T3), whereas NO concentration was significantly lower than the non-treated group. Results are expressed as mean \pm standard error (SE) for at least five animals. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

DISCUSSION

The study of skin and soft-tissue lesions in PCM is important not only because of their frequency, difficulty of treatment and diagnostic value for the disease but also because they predispose patients to secondary bacterial infections (6, 7, 19).

Tissue wound healing is a complex process that depends on multiple molecular interactions between cells and that involves a series of events such as chemotaxis, inflammation, synthesis of extracellular matrix components, angiogenesis, granulation tissue formation and tissue remodeling (20).

Because of the discomfort evoked by PCM lesions and collateral drugs effects, the helium-neon (HeNe) *laser* irradiation can represent an excellent tool since its microbicidal effect, wound healing properties and non-invasive characteristics are already well known (9, 10, 21, 22, 23, 24, 25). Although the exact mechanism of *laser* therapy is not fully understood, it is known that it reduces the time and improves the quality and tensile strength of tissue repair, neutralizes inflammation, and provides pain relief at injured tissue areas by biostimulation of cellular events (12, 13, 26, 27). In leukocytes, the therapeutic effect of HeNe *laser* begins with photo-chemical reactions that are able to enhance the phagocytic activity and to increase the synthesis of bactericidal substances, like nitric oxide (NO) and peroxide anion, by a mechanism that involves the increased permeability of cell membranes to ions including Ca^{2+} (25, 26, 27). Moreover, under the action of HeNe *laser* the enzyme superoxide dismutase (SOD), which is responsible for catalyzing the reaction that converts superoxide radicals into oxygen and hydrogen peroxide (a potent killer of microbes), is reactivated (27, 28).

Histopathological results presented here showed that *laser* treatment of lesions was efficient in accelerating tissue repair since epidermis and dermis are better organized with

increased collagen deposition and granulation tissue formation, which represent typical processes of fibrogenesis. Evidence that *laser* photostimulation increases collagen synthesis has already been obtained from different studies (14, 29, 30, 31). Beyond these effects, lesions that were exposed to three sessions of HeNe *laser* irradiation present less viable fungi and this fact certainly minimizes fungal infection dermal effects.

NK and NKT lymphocyte subpopulations are critical in protection against pathogens (32, 33, 34). In experimental PCM, NK cells are very effective during the precocious phase of the disease and are involved in natural host resistance against the fungus since they would be potential sources of interferon-gamma (IFN- γ) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) at an early stage of infection (32, 33, 34, 35, 36). Data presented here show an increase in the percentage of NK and NKT cells in *laser*-treated animals. Previously, we have demonstrated increased levels of IFN- γ in animals treated with the *laser*, which may be, at least partially, produced by NK cells (14). The increase of these cells in animals treated with one session of irradiation may be the result of a major attraction of these cells to injury, helping to control and limit the spread of the pathogen by both directly and/or inducing death by producing IFN- γ that is important for phagocyte activation.

The prolonged presence of neutrophils in PCM lesions has long been reported (19, 37, 38). However, neutrophils are less efficient in eliminating *Paracoccidioides brasiliensis* as compared with macrophages, since many of them are susceptible to infection due to deficiencies in the process of phagocytosis of pathogens (39, 40). Here, we observed that *laser*-treated lesions show reduced percentage of neutrophils and substantially increased percentage of macrophages.

Macrophages play a central role in wound healing and are the main phagocytic cells in tissue repair, removing pathogens in addition to the remaining fragments (debris) from tissues,

cells and matrix (41, 42). When activated at the injury site, they secrete large amounts of growth factors and cytokines amplifying the initial signals released by degranulation of platelets and neutrophils (42). Some growth factors such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulate proliferation of endothelial cells, which are likely to have pro-angiogenic activity in tissue healing (42). So, the greatest number of macrophages in *laser*-treated lesions can indicate an antifungal response more efficient as well as a healing process more advanced, which is consistent with the histopathological findings.

It is well established that activated macrophages kill phagocytosed pathogens by converting molecular oxygen into reactive oxygen intermediates (ROIs), and by producing reactive nitrogen intermediates, particularly nitric oxide (NO), through the action of an enzyme called inducible nitric oxide synthase (iNOS). Indeed, in the current experimental model of PCM, we have observed that *laser*-treated mice present significant increase in iNOS protein expression and NO release.

This increase in NO release observed in *laser*-treated animals, is certainly related to greater fungicidal activity of macrophages and increased resistance to infection PCM, as already observed by other authors (43, 44). Our experimental model also revealed that after three *laser* sessions the NO released is reduced. This may be related to an accelerated healing because of a greater elimination of the pathogen, and, therefore, a milder inflammatory process. In fact, the literature has shown that an overproduction of NO, or a continuous production over a long period, can enhance host susceptibility to the fungus, making wound healing difficult (45, 46). *In vitro* experiments to evaluate the formation of nitric oxide, peroxynitrite, and superoxide anion radical in mice peritoneal macrophages exposed to HeNe *laser* radiation are being conducted in

our laboratory and such results certainly will improve our understanding regarding the effects of *laser* therapy on macrophages.

Data presented here also show significant differences between *laser*-treated and non-treated animals in relation to the superoxide dismutase (SOD) activity. SOD is an enzyme which catalyzes the dismutation of superoxide radicals ($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) and such a reaction may play an important role in PCM lesion for two reasons. The first reason is that high concentrations of superoxide radical (O_2^-) can delay the healing process because of its interaction with NO to form peroxynitrite-anion with the subsequent formation of hydroxyl radical, which has an extremely potent cytotoxic effect (27, 47). The second reason is that increased generation of hydrogen peroxide (H_2O_2) plays an important role in the elimination of microbes (44, 48, 49). Thus, the increase in SOD activity observed in *laser*-treated animals results in both the reduced concentration of superoxide, which leads to an acceleration of wound healing, and a greater release of H_2O_2 , which is an important inflammatory mediator involved in the resistance against *P. brasiliensis* (49, 50, 51, 52).

We have also evaluated the direct action of HeNe *laser* on *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells and the results show that HeNe *laser* is able to modify, or even destroy, fungal structures that are used by the pathogen as resistance mechanisms (manuscript in preparation). Certainly, this fungistatic/fungicidal activity of the *laser* also plays an important role in accelerating the wound healing process.

Altogether our results indicate a dual effect of the *laser* treatment, decreasing the inflammatory response and accelerating the healing of the lesions. We believe that HeNe *laser* is a new non-harmful strategy that may be used as an adjuvant tool to be combined with anti-fungal agents for improving the treatment of PCM lesions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the valuable technical assistance with the animals provided by Marcos C. Meneghetti. We are indebted to Dr^a Maria Alice da Cruz Höfling for her important collaboration with the microscopy and Dr^a Elza Costa Cruz Vasconcellos for the *laser* apparatus. The authors are pleased to acknowledge financial support by the state-granting agency (FAPESP/#2010/08485-5).

REFERENCES

1. Restrepo A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23, 323-334.
2. Severo L.C., Geyer G.R., Londero A.T., Porto N.S., Rizzon C.F. (1979) The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 67(2), 115-118
3. Brummer E., Castaneda E., Restrepo A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6, 89-117
4. Restrepo A. (2000) Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: Implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med. Mycol.* 38, 317–322.
5. Borges-Walmsley M.I., Chen D., Shu X. and Walmsley A.R. (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 10, 80–87.

6. Lupi O., Tying S.K. and McGinnis M.R. (2005) Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, 931–951.
7. Trent J.T. and Kirsner R.S. (2003) Identifying and treating mycotic skin infections. *Adv. Skin Wound Care.* 16, 122–129.
8. Andriole V.T. (1999) The 1998 Garrod lecture. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 44(2), 151-162.
9. Jovanovic L., Mirkovic B. and Zivkovic B. (1998) Soft *laser* in the therapy of herpes simplex labialis. *The Scientific Journal Facta Universitatis.* 5, 61–63.
10. Yu H., Chang K.L., Yu C.L., Chen J.W.V. and Chen G.S. (2003) Helium neon *laser* irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 120, 56–64.
11. Qadri T., Miranda L., Tunér J. and Gustafsson A. (2005) The short-term effects of low-level *lasers* as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* 32, 714–719.
12. Karu T. (1989) Photobiology of low-power *laser* effects. *Health Phys.* 56, 691–704.

13. Pugliese L.S., Medrado A.P., Reis S.R., Andrade Z. de A. (2003) The influence of low-level *laser* therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui. Odontol. Bras.* 17(4), 307-313.
14. Ferreira M.C., Brito V.N., Gameiro J., Costa M.R., Vasconcellos E.C., Cruz-Hofling M.A. and Verinaud L. (2006) Effects of HeNe *laser* irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 84, 141–149.
15. Ferreira M.C., Gameiro J., Nagib P.R.A., Brito V.N., Vasconcellos E.C. and Verinaud L. (2009) Effect of Low Intensity Helium–Neon (HeNe) *Laser* Irradiation on Experimental Paracoccidioidomycotic Wound Healing Dynamics. *Photochem. Photobiol.* 85, 227–233.
16. Nagib P.R.N., Gameiro J., Alves da Costa T., Di Gangi R., Ribeiro J.S., Paulino L.C. and Verinaud L. (2010). Effect of HeNe *laser* irradiation on extracellular matrix deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccidioidomycotic lesions. *Photochem. Photobiol.* 86, 920-924.
17. Sano A., Nobuyuki K., Iabuki K. (1993). A comparative study of four different staining methods for stimulation of live yeast of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol.* 124, 157-161.
18. Collins T.J. (2007) Image J for microscopy. *BioTechniques* 43, 25–30.

19. Franco M.F., Montenegro M.R. (1982) Anatomia Patológica. In Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM, eds. Paracoccidioidomicose – blastomicose sul-americana. Sarvier- DUSP, 97.
20. Azouz A., Razzaque M.S., El-Hallak M. and Taguchi T. (2004) Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. Med. Electron. Microsc. 37(3), 141-8.
21. Mester E., Spiry T., Szende B. and Tota J.G. (1971) Effect of *laser* rays on wound healing. Am. J. Surg. 122, 532-535.
22. Vladimirov Y.A., Osipov A.N. and Klebanov G.I. (2004) Photobiological principles of therapeutic applications of *laser* radiation. Biochem. (Moscow) 69(1), 81-90.
23. Gigo-Benato D., Geuna S. and Rochkind S. (2005) Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. Muscle Nerve 31(6), 694-701
24. Posten W., Wrone D.A., Dover J.S., Arndt K.A., Silapunt S. and Alam M. (2005) Low-level *laser* therapy for wound healing: mechanism and efficacy. Dermatol. Surg. 31(3), 334-40.
25. Chung H., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D. and Hamblin M.R. (2012) The nuts and bolts of low-level *laser* (light) therapy. Ann. Biomed. Eng. 40(2), 516-33.
26. Klebanov G.I. and Poltanov E.A. (2003) Primary free-radical and secondary molecular-cellular mechanisms behind *laser* therapy. Laser Physics 13(1), 70-83.

27. Klebanov G.I., Poltanov E.A., Chichuk T.V., Osipov A.N., Vladimirov Y.A. (2005) Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne *laser* radiation. *Biochem. (Moscow)* 70(12), 1335-40.
28. Lubart R., Eichler M., Lavi R., Friedman H., Shainberg A. (2005) Low-energy *laser* irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed. Laser Surg.* 23(1), 3-9.
29. Saperia D., Glassberg E., Lyons R.F., Abergel R.P., Baneux P., Castel J.C., Dwyer R.M. and Uitto J. (1986) Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with He-Ne *laser*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138(3), 1123–1128.
30. Reddy G.K., Stehno-Bittel L. and Enwemeka C.S. (1998) *Laser* photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg. Med.* 22, 281–287.
31. Silveira P.C., Silva L.A., Freitas T.P., Latini A. and Pinho R.A. (2011) Effects of low-power *laser* irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med. Sci.* 26(1), 125-31.

32. Peraçoli M.T., Soares A.M., Mendes R.P., Marques S.A., Pereira P.C. and Rezkallah-Iwasso M.T. (1991) Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 29(6), 373-80.
33. Peraçoli M.T., Fortes M.R., Da Silva M.F., Montenegro M.R. (1995) Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37(2), 129-36.
34. Pagliari C., Pereira N.V., Kanashiro L., Stegun F.W., Croda J., Duarte M.I. and Sotto M.N. (2010) Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J. Cutan. Pathol.* 37(5), 565-570.
35. Dunn P.L. and North R.J. (1991) Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* 59(9), 2892-900.
36. Levitz S.M. and North E.A. (1996) gamma Interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 64(5), 1595-9.
37. Calich V.L., Singer-Vermes L.M., Siqueira A.M. and Burger E. (1985) Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 66(5), 585-94.

38. Acorci M.J., Dias-Melicio L.A., Golim M.A., Bordon-Graciani A.P., Peraçoli M.T. and Soares A.M. (2009) Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. *Scand. J. Immunol.* 69(2), 73-9.
39. Goihman-Yahr M., Essensfeld-Yahr E., de Albornoz M.C., Yarzabal L., de Gómez M.H., San Martín B., Ocanto A., Gil F. and Convit J. (1980) Defect of *in vitro* digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 28(2), 557-66.
40. Dias M.F., Mesquita J., Filgueira A.L., De Souza W. (2008) Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. *Med. Mycol.* 46(3), 241-9.
41. Leibovich S.J. and Ross R. (1975) The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* 78(1), 71-100.
42. Martin P. (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309), 75-81.
43. Gonzalez A., de Gregori W., Velez D., Restrepo A. and Cano L.E. (2000) Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* 68(5), 2546-52.

44. Moreira A.P., Dias-Melicio L.A., Peraçoli M.T., Calvi S.A. and Victoriano de Campos Soares A.M. (2008) Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia* 166(1), 17-23.
45. Nascimento F.R., Calich V.L., Rodríguez D. and Russo M. (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J. Immunol.* 168(9), 4593-600.
46. Nishikaku A.S., Molina R.F., Ribeiro L.C., Scavone R., Albe B.P., Cunha C.S. and Burger E. (2009) Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 198(2), 123-35.
47. Ducrocq C., Blanchard B., Pignatelli B., Ohshima H. (1999) Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55(8-9), 1068-77.
48. Carmo J.P., Dias-Melicio L.A., Calvi S.A., Peraçoli M.T. and Soares A.M. (2006) TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med. Mycol.* 44(4), 363-8.
49. Rodrigues D.R., Dias-Melicio L.A., Calvi S.A., Peraçoli M.T. and Soares A.M. (2007) *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med. Mycol.* 45(1), 27-33.

50. Phan T.T., Wang L., See P., Grayer R.J., Chan S.Y. and Lee S.T. (2001) Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biol. Pharm. Bull.* 24(12), 1373-9.

51. Kerkweg U., Petrat F. and Korth H.G. (2007) Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *Shock.* 27, 552–558.

52. Silveira P.C., Streck E.L. and Pinho R.A. (2007) Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level *laser* therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 86(3), 279-82.