

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB  
FACULDADE DE CEILÂNDIA-FCE  
CURSO DE FISIOTERAPIA

PRISCILA DO VALE NOGUEIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA IRRADIAÇÃO  
DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO FUNGO  
PATOGENICO HUMANO *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS*

PRISCILA DO VALE NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA IRRADIAÇÃO  
DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO FUNGO  
PATOGENICO HUMANO *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade de Brasília –  
UnB – Faculdade de Ceilândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em Fisioterapia.

Orientador (a): Prof. Dr. Larissa Fernandes  
Matos

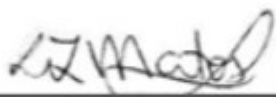
Coorientador (a): Prof. Dr. Emerson Fachin  
Martins

PRISCILA DO VALE NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA IRRADIAÇÃO  
DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO FUNGO  
PATOGENICO HUMANO *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS***

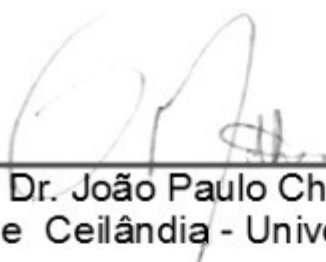
Brasília, 09 / 07 / 2013

**COMISSÃO EXAMINADORA**




---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Fernandes Matos  
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB  
Orientadora



---

Prof. Dr. João Paulo Chieregato Matheus  
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB



---

Prof.Dr. Alex Leite Pereira  
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB

## **AGRADECIMENTO**

*A Deus, por sempre me dar sinais de sua presença em minha vida, por tranquilizar minha mente e espírito em momentos difíceis, deixando sempre a certeza de um futuro bom.*

*Aos meus pais, Francisco e Tereza, por fazerem dos meus sonhos os seus, pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim.*

*Aos meus irmãos e melhores amigos, Wellington e Eloisa, pela cumplicidade, alegria e amor. Por fazerem parte das melhores lembranças que tenho do passado e por tornarem o meu presente mais feliz.*

*A irmã que a vida me presenteou, Dalilla Matilde, pelo companheirismo e crescimento que sua amizade tem me oferecido. A toda sua família, que me faz sentir sempre tão acolhida e bem-quista.*

*Aos meus colegas de curso, por fazerem dessa caminhada algo mais leve e prazeroso de se viver. Especialmente a Samira Azar, amiga fiel e companheira de quem espero nunca me separar. A Nádyá e Rosane, por estarem ao meu lado nessa fase final, pelas grandes amigas que se tornaram, por serem sempre tão compreensivas e prestativas. E ao Abraão Souza, pelo carinho que despertou em mim desde o início, pela forma como se relaciona com todos e por sua disposição constante em ajudar.*

*A minha orientadora, Larissa Fernandes, pela experiência de grande aprendizado que me proporcionou, por toda sua paciência e cuidado. Ao meu co-orientador, Emerson Fachin, por suas contribuições para o projeto e para minha formação profissional. A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa.*

*Ao CNPq, agência financiadora da pesquisa.*

*“When you've seen beyond yourself  
Then you may find peace of mind is waiting there  
And the time will come when you see  
We're all one and life flows on within you and without  
you”* George Harrison

## RESUMO

NOGUEIRA, Priscila do Vale. Avaliação *in vitro* do efeito da irradiação de laser de baixa potência no fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans*. 2013. 33f. Monografia (Graduação) - Universidade de Brasília, Graduação em Fisioterapia, Faculdade de Ceilândia. Brasília, 2013.

O Laser de Baixa Potência possui várias aplicações e na fisioterapia seus efeitos analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante são os mais explorados. Apesar desses efeitos serem desejados no tratamento das lesões cutâneas infectadas, o uso do laser não é recomendado por considerar que ele estimule a proliferação celular de microrganismos. Ainda não existem evidências quanto a isso. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito do laser de baixa potência na viabilidade e na expressão dos fatores de virulência do fungo patogênico *C. neoformans*, o agente etiológico da criptococose. Esta doença pode apresentar-se como infecção cutânea e é geralmente tratada com antifúngicos, um tratamento longo e com efeitos colaterais diversos. O laser representa uma possível nova forma de tratamento para estas lesões, de forma não prejudicial e eficiente. A pesquisa foi realizada em três etapas: avaliação da viabilidade de *C. neoformans* após a irradiação do laser, a avaliação fenotípica e da virulência, e avaliação da expressão dos genes envolvidos em sinalização e proliferação celular e estresse oxidativo. Na primeira etapa, encontrou-se uma redução significativa da viabilidade em ambos comprimentos de onda, sendo que no de 904nm essa redução apareceu em quase todas as dosimetrias empregadas e no de 660nm, apenas quando irradiado 200J. Não houve alteração dos fatores de virulência e, na terceira etapa, apenas o gene que codifica a subunidade catalítica da calcineurina foi influenciado pela irradiação (200J, 904nm), nos demais não houve alterações transcricionais significativas em nenhuma das condições testadas.

Palavras-chave: Laser terapêutico, cicatrização, infecções cutâneas, *C.neoformans*.

## ABSTRACT

NOGUEIRA, Priscila do Vale. *In vitro evaluation of the effect of irradiation of low-power laser in the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans*. 2013. 12f. Monograph (graduation) – University of Brasília, Graduation in Physiotherapy, Faculty of Ceilândia. Brasília, 2013.

There are many applications of the Low Power Laser, in physiotherapy, the analgesic, anti-inflammatory and cicatrizing effects are the most exploited. These effects are desirable for skin treatment on infected wounds/lesions, but lasers are not recommended due to the fact that it may stimulate the proliferation of microorganisms, although there is no evidence about that until now. The purpose of this study was to evaluate the effect of low power laser in vitro, the viability and the expression of virulence factors in the pathogenic fungus *C. neoformans*, etiological agent of cryptococcosis. This disease can present as skin infection, usually treated with antifungal medication, eventhough it is a slow cure with several side effects. The use of laser could be a new treatment, with less side effects and more efficient cure, for these injuries. The research was conducted in three stages: evaluating the viability of *C. neoformans* after laser irradiation, virulence and phenotype analysis, and evaluat on of genes related to signaling, cell proliferation and oxidative stress. In the first stage, we found a significant reduction of viability at both wavelengths, 904nm and 660nm. The reduction at 904nm appeared with almost all of the dosimetry applied, and at 660nm, reduction was only observed when irradiated with 200J. There were no changes in virulence factors, and in the third stage, only the gene encoding catalytic subunit of calcineurin was influenced by irradiation (200 J, 904 nm), in the others there were no significant transcriptional changes under any of the conditions tested.

Key Words: Laser therapy, wound healing, skin infections, *C. neoformans*

**SUMÁRIO**

1- INTRODUÇÃO.....	9
2- MÉTODOS.....	13
2.1- Irradiação de <i>C. neoformans</i> com laser de baixa potência.....	13
2.2- Avaliação fenotípica e da virulência in vitro das leveduras pós tratamento fotodinâmico.....	13
2.3- Avaliação da expressão dos genes envolvidos em sinalização celular, proliferação e estresse oxidativo.....	14
2.4- Efeito do laser sobre macrófagos, antes e após a fagocitose do fungo.....	15
2.5- Análise estatística.....	15
3- RESULTADOS.....	16
3.1- Irradiação de <i>C. neoformans</i> com laser de baixa potência.....	16
3.2- Avaliação fenotípica e da virulência in vitro das leveduras pós tratamento fotodinâmico.....	16
3.2.1- Melanina.....	16
3.2.2- Fosfolipase.....	17
3.2.3- Parede celular.....	18
3.3- Avaliação da expressão dos genes envolvidos em sinalização celular, proliferação e estresse oxidativo.....	19
3.4- Efeito do laser sobre macrófagos, antes e após a fagocitose do fungo.....	20
4- DISCUSSÃO.....	21
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26



## 1- INTRODUÇÃO

A sigla LASER significa: Amplificação de Luz pela Emissão Estimulada de Radiação. Trata-se de uma luz eletromagnética polarizada, não ionizante, cuja emissão se dá de forma coerente, monocromática e colimada<sup>1,2</sup>. A coerência diz respeito à relação coincidente das ondas eletromagnéticas no tempo e no espaço. O laser emite fótons com um mesmo comprimento de onda e, portanto, mesma energia, o que explica a monocromaticidade. A colimação, por sua vez, traduz a característica das ondas manterem um ângulo de dispersão muito pequeno, gerando um ponto de elevada densidade de energia<sup>3</sup>.

Existem basicamente 2 tipos de laser: de alta potência (ou cirúrgico) e de baixa potência (ou terapêutico). O primeiro produz efeito térmico e é largamente empregado em cirurgias para coagular, seccionar ou vaporizar tecidos. O segundo é dito terapêutico, por respeitar o limiar de sobrevivência da célula, emitindo baixa intensidade de energia e baixa densidade de potência<sup>4</sup>. Ele foi inicialmente considerado um bioestimulador das funções celulares, pelos excelentes resultados obtidos com sua utilização no tratamento de feridas e úlceras, acelerando a cicatrização. Hoje, sabe-se que além de estimular, o laser de baixa potência pode retardar certos processos biológicos, sendo mais adequado considerá-lo um agente físico biomodulador<sup>5</sup>.

Os efeitos terapêuticos do laser sobre os tecidos são amplos, destacando-se os trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos<sup>6</sup>. A eficácia clínica do laser na cicatrização de feridas é um dos principais efeitos reportados na literatura. No entanto, uma revisão que reuniu estudos sobre o alívio de pressão no leito, a terapia de compressão e recursos eletromagnéticos na prevenção e tratamento de úlceras crônicas concluiu que os últimos (entre os quais se incluía o laser) são carentes de evidências confiáveis<sup>7</sup>. Isso está relacionado a falta de consenso sobre os protocolos terapêuticos, que dificulta a comparação multicêntrica de muitos ensaios clínicos publicados.

Sabe-se que o principal fator determinante da absorção de luz em tecidos biológicos é o comprimento de onda. Basicamente, os protocolos terapêuticos utilizam o laser de baixa potência em duas faixas de comprimentos de onda – vermelho (630-700nm, mais utilizado 660nm) e infravermelho (700-904nm, mais utilizado 904nm), sendo o primeiro menos penetrante que o segundo. No entanto, reconhece-se que a dosimetria deve gerar uma energia suficientemente elevada para induzir a reação desejada no tecido. Esse parâmetro envolve o "tempo" e, por conseguinte, determina a quantidade de

sangue em circulação que é exposta ao laser, podendo gerar a ativação do sistema imune e modulação de efeitos sistêmicos<sup>8,9</sup>. Hopkins *et al* realizou um estudo triplo-cego, controlado por placebo, e concluiu que o laser acelerou a regeneração tecidual de abrasões induzidas no antebraço de humanos, assim como de lesões circundantes à área tratada<sup>10</sup>, o que atesta esse efeito mais abrangente de certas dosimetrias. O tempo de exposição e comprimento de onda variam em virtude do tecido, do estado geral do paciente e do efeito desejado<sup>11</sup>.

No tratamento da tendinite de calcâneo, o laser mostra-se potencialmente eficaz e seus efeitos benéficos estão diretamente relacionados à dosagem<sup>12</sup>. O mesmo ocorre na artrite reumatóide<sup>13</sup>, epicondilite lateral<sup>14</sup> e osteoartrite<sup>15</sup>. Alguns dos estudos mais recentes vem identificando benefícios da sua utilização também no tratamento de linfedema pós mastectomia. Os prováveis mecanismos induzidos pelo laser e que auxiliariam na redução do volume do edema são: promoção da linfagiogênese e estimulação da motilidade do fluxo linfático, melhora da circulação linfática geral e redução da fibrose intersticial que acompanha a linfa estase<sup>16</sup>. Todavia, considera-se também que o laser possa favorecer o desenvolvimento de recidiva ou metástase, necessitando-se de estudos que comprovem a segurança deste procedimento<sup>17</sup>.

Os efeitos do laser conduzem a uma ampla aplicabilidade clínica que se estende também às áreas médica e odontológica. Naeser *et al*. avaliou os efeitos do laser nos sintomas da síndrome do túnel o carpo. A aplicação foi dirigida a pontos de acupuntura e resultou na redução acentuada ou completa da dor no punho por até 3 anos<sup>18</sup>. Ao utilizar-se desse recurso no tratamento da dor inerente a movimentação dentária causada por aparelhos ortodônticos houve uma redução significativa dos escores médios de dor, assim como uma maior incidência de ausência completa do sintoma<sup>19</sup>. Tratamento e prevenção de mucosites orais<sup>20</sup>, disfunção temporomandibular com dor miofascial<sup>21</sup> e hipersensibilidade dentinária<sup>22</sup> são outras formas de utilização terapêutica do laser. Apesar da sua crescente aplicação na clínica médica, recomenda-se o uso do laser com cautela em pacientes com infecções, pois se acredita que o laser estimule a proliferação celular de microrganismos, no entanto não existem dados que suportam tal informação.

A criptococose é uma doença potencialmente fatal e cosmopolita causada pelo fungo *C. neoformans*, sendo portanto uma das contra-indicações para o uso do laser. Este microrganismo pode causar infecções em pacientes imunocompetentes bem como em pacientes imunocomprometidos (maior incidência). Aproximadamente 6-8% dos pacientes com infecção avançada de HIV apresentam infecção também por *C.*

*neoformans*, o que o caracteriza como oportunista<sup>23</sup>. A via de infecção clássica se dá pela inalação de propágulos fúngicos aerossolizados do solo ou de árvores contaminadas com excrementos de pombos, sendo que o hospedeiro pode permanecer com a doença latente ou desenvolvê-la, o que varia com as condições imunológicas. Hospedeiros que desenvolvem a doença pulmonar podem apresentar quadros de infecções crônicas ou de resposta inflamatória com formação de granuloma<sup>24</sup>.

A criptococose pode apresentar-se também como infecção cutânea tanto em pacientes imunocompetentes infectados pela inoculação direta na pele (forma primária, lesão localizada), como em pacientes imunocomprometidos, nos quais se observa a forma secundária da doença, via disseminação hematogênica<sup>25</sup>. O tratamento da criptococose cutânea primária é feito por meio da administração oral de compostos azólicos por vários meses até a completa recuperação do paciente, enquanto que a doença cutânea secundária tem difícil tratamento, utilizando azóis, por se tratar de pacientes que apresentam alguma falha do sistema imunológico, seja por HIV ou uso de imunossupressores – transplantados de órgãos sólidos, com uma taxa de óbito de 16% nos primeiros 90 dias de tratamento decorrente de insuficiência renal, um dos efeitos colaterais dos antifúngicos<sup>26</sup>.

Além do fato de que os tratamentos convencionais de criptococose serem prolongados e causarem diversos efeitos colaterais, devido a alta toxicidade dos antifúngicos, diversas cepas resistentes as drogas disponíveis no mercado têm surgido. Neste cenário, a procura por novas formas de tratamento de micoses vem se tornando uma necessidade crescente. A utilização do laser de baixa potência, apesar de ter sido por muitos anos contra-indicado para o tratamento de infecções, vem sendo aplicado terapêuticamente na clínica odontológica com resultados positivos para tratamento de infecções, como candidíase oral e herpes labial. No presente trabalho pretendeu-se avaliar se as leveduras de *C. neoformans* teriam sua capacidade proliferativa e sua virulência, afetadas pelo laser de baixa potência em diferentes dosimetrias e comprimentos de onda. Além disto, avaliar a expressão de genes envolvidos com sinalização e proliferação celular (RAS, Calcineurina – CNA), estresse oxidativo (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT) e fosforilação oxidativa (citocromo-C-oxidase - COX) após a irradiação de laser em *C. neoformans*, visto que não se conhecem os efeitos do laser em microrganismos. Os objetivos específicos foram: (1) avaliar o efeito de diferentes dosimetrias nos comprimentos de onda 660nm e 904nm – 0, 10, 25, 50, 100

e 200 J/cm<sup>2</sup>. – na viabilidade de *C. neoformans*, (2) identificar se a irradiação de diferentes doses de laser de baixa potência (660nm e 904nm) tem algum efeito na virulência de *C. neoformans* e (3) avaliar a expressão de genes envolvidos com sinalização celular, proliferação celular e estresse oxidativo no modelo biológico *C. neoformans*.

## 2- MÉTODOS

### 2.1- Irradiação de *C. neoformans* com laser de baixa potência

Foi utilizada a linhagem KN99 $\alpha$  de *C. neoformans* (sorotipo A), para avaliação do efeito do laser de baixa potência. O aparelho utilizado foi o Laser Endophoton LLT-IR (KLD Biosistemas), que apresenta os seguintes parâmetros: Frequência – 1000Hz, potência média 20mW, área do feixe colimado 0,035cm<sup>2</sup> (660nm, emissão contínua) e potência média 50mW e área do feixe divergente 0,01 cm<sup>2</sup>, (904nm, emissão pulsada). As dosimetrias [Dosimetria(J/cm<sup>2</sup>) = P(W) x T(s)/ A(cm<sup>2</sup>)] testadas foram as seguintes: 0, 10, 25, 50, 100 e 200 J/cm<sup>2</sup>.

As leveduras de *C. neoformans* foram crescidas por 12h (30° C), coletadas por centrifugação, lavadas com solução salina e ressuspensas na concentração de 10<sup>7</sup> células/mL. Alíquotas de 100 $\mu$ L (10<sup>6</sup> células) foram aplicadas em placas de 96 poços e irradiadas com as diferentes dosimetrias acima mencionadas. Após a aplicação do laser, 10 $\mu$ L (10<sup>5</sup> células) dessa suspensão foram diluídos em 990 $\mu$ L de salina, da qual 10 $\mu$ L (10<sup>3</sup> células) foram plaqueadas em meio YPD sólido (10 g/L extrato de levedura, 20g/L Peptona, 20g/L glicose, 20g/L ágar, pH 5,6). A contagem das Unidades Formadoras de colônias (UFC) foi realizada após incubação a 30° C por 48 horas. Ao comparar com o controle (leveduras não irradiadas) foi possível determinar os efeitos da ação do laser na viabilidade de *C. neoformans*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, para avaliação.

### 2.2- Avaliação fenotípica e da virulência *in vitro* das leveduras pós-tratamento fotodinâmico

Após estabelecimento dos parâmetros que apresentaram melhor efeito de inativação fúngica (Doses 10 e 200J/cm<sup>2</sup> para ambos comprimentos de onda), as leveduras foram irradiadas e avaliadas *in vitro* quanto à capacidade de produzir melanina, que é um fator de virulência fúngica bem conhecido e estudado em *C. neoformans*. Para visualização da produção de melanina, leveduras foram inoculadas em meio Agar Níger (70g/L sementes de niger trituradas, 1 g/L glicose, 20g/L ágar) e submetidas a crescimento a 30°C por 48 horas. Colônias incapazes de sintetizar melanina cresceriam albinas nesse meio de cultura. A produção de fosfolipase também foi verificada. Para visualização da produção de melanina, leveduras foram inoculadas em meio Agar Níger (70g/L sementes de niger trituradas, 1 g/L glicose, 20g/L ágar) e submetidas a

crescimento a 30°C por 48 horas. Colônias incapazes de sintetizar melanina cresceriam albinas nesse meio de cultura. A produção de fosfolipase também foi verificada. Para tanto utilizou-se o mesmo protocolo de irradiação e inoculação, mas com o meio ágar fosfolipase (peptona 10g/L, glicose 20g/L, cloreto de sódio 57g/L, cloreto de cálcio 5,5 g/L, Ágar 20g/L e suplementado pela emulsão de ovo à 50% em solução fisiológica). A leitura do teste foi realizada após 5 dias de incubação a 30°C, sendo considerado como positivo a produção de zona opaca de precipitação ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida por meio da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática, sendo os resultados apresentados em códigos: valor 1 quando  $Pz = 1,0$  (ausência de atividade enzimática), valor 2 quando  $0,64 < Pz < 1,0$  (atividade enzimática positiva) e valor 3 quando  $Pz \leq 0,63$  (atividade enzimática fortemente positiva).

Além dos fenótipos de virulência, foi avaliada a capacidade das leveduras crescerem a 37° C em YPD e na presença de Congo Red 0,5 e 1% (CR). Leveduras que apresentassem danos na parede celular causado pelo efeito do laser apresentariam dificuldade de crescimento neste meio de cultura (YPD+ CR).

### **2.3- Avaliação da expressão dos genes envolvidos em sinalização e proliferação celular e estresse oxidativo**

Após estabelecidos os parâmetros que apresentaram alteração na viabilidade fúngica, as leveduras irradiadas foram então coletadas e o RNA total extraído com Trizol (Invitrogen) para avaliação por PCR em tempo real da resposta transcricional dos genes selecionados pela ação do laser. Após a extração do RNA total de *C. neoformans* foi realizada a transcrição reversa com 200 ng de RNA total utilizando o kit cDNA High Capacity (Applied Biosystems) e o cDNA obtido foi analisado por meio da técnica de PCR em tempo real. O kit empregado para quantificação da expressão dos genes CNA (calcineurina subunidade catalítica), RAS1, SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e COX (Citocromo c-oxidase) foi o Syber Fast (Applied Biosystems) e o controle interno foi o gene que codifica actina (ACT) de *C. neoformans*. Todos os oligonucleotídeos utilizados (tabela 1), exceto para o gene COX (que não possui intron) foram desenhados na junção exon – exon para evitar ampliações decorrentes de contaminação com DNA genômico. O aparelho utilizado para os experimentos de PCR em tempo real foi o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo n=3.

#### **2.4- Efeito do laser sobre macrófagos, antes e após a fagocitose do fungo.**

Foram utilizados macrófagos da linhagem J774-A1 cultivados em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino. Inicialmente, avaliou-se a interação do laser com os macrófagos, isoladamente, a fim de identificar qualquer alteração que pudesse ser induzida pela irradiação e que pudesse comprometer a análise dos resultados finais. Descartada essa hipótese, pôde-se prosseguir com os ensaios de fagocitose. Para preparação dos macrófagos, seguiu-se o mesmo procedimento, com utilização do meio DMEM e placa de 96 poços para incubação (à 30°C). Nesta fase dos experimentos, era preparado também o inóculo do fungo. No segundo dia, o inóculo foi centrifugado e lavado em PBS, para posterior contagem e ressuspensão. O fungo foi então associado ao anticorpo 18B7 e, logo após, aos macrófagos preparados no dia anterior. A suspensão resultante foi incubada à 30°C, por duas horas, intervalo de tempo suficiente para que a fagocitose ocorresse. Logo após, as amostras foram irradiadas e o meio de cultura trocado, para que as células não fagocitadas fossem também descartadas. Prosseguiu-se com a lise das células, plaqueio em meio YPD sólido e incubação (30°C, 48 horas).

#### **2.5- Análise estatística**

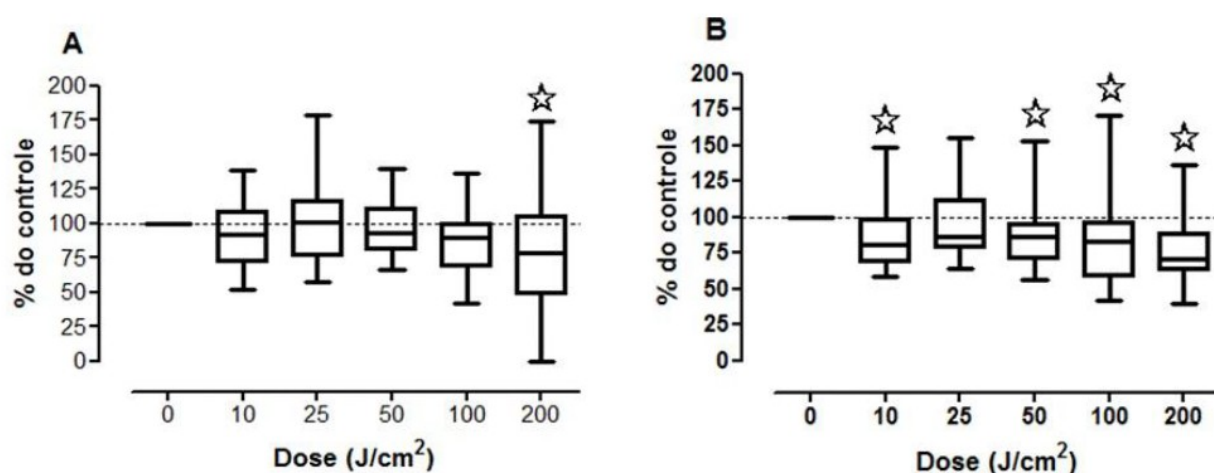
Inicialmente utilizou-se de estatística descritiva (média e erro-padrão) para caracterização dos resultados de viabilidade, que foram repetidos ao final, nos ensaios com macrófagos. Para os primeiros, os testes de normalidade de Shapiro-Wilk apontaram distribuição não-gaussiana para grande parte dos valores referentes as doses com irradiação de 904 nm, por esse motivo optou-se por realizar testes não-paramétricos para análise dos resultados, mais especificamente o teste de Kruskal-Wallis, ideal para comparação de três ou mais grupos independentes. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para análise estatística dos resultados da expressão dos genes selecionados foi utilizado Anova, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Este último possibilitou testar o contraste entre as duas médias: O controle 0J (sempre igual a 1) e a média dos resultados do Real Time para cada uma das dosimentrias.

### 3- RESULTADOS

#### 3.1- Irradiação de *C. neoformans* com laser de baixa potência

Observou-se que o Laser de Baixa Potência exerce influência sobre a viabilidade do fungo. Houve um declínio na quantidade de colônias crescidas de *C. neoformans*, principalmente para as doses de irradiação maiores (Figura 1). Apesar da redução no número de colônias ter sido observada em todas as doses e comprimentos de onda, percebe-se que em algumas o efeito foi mais acentuado, formando uma curva que muito se assemelha ao princípio de Arndt-Schultz, da fotobiomodulação. Ele preconiza que o efeito, seja ele inibidor ou estimulador, apenas ocorrerá se a energia produzida for elevada o suficiente para ser absorvida pelo tecido. Basicamente, os efeitos dose-dependente foram assim descritos: Estímulos baixos podem não ter efeito biológico, os moderados podem ter efeito bioestimulador e estímulos maiores podem ter efeitos tóxicos ou bioinibitório. A dose para a qual o declínio foi estatisticamente significativo nos dois comprimentos de onda foi 200 J/cm<sup>2</sup>. Apesar disso, os testes subsequentes foram realizados também para a menor dose (10 J/cm<sup>2</sup>), já que na prática clínica do fisioterapeuta as doses menores são as mais usualmente empregadas no tratamento com laser.



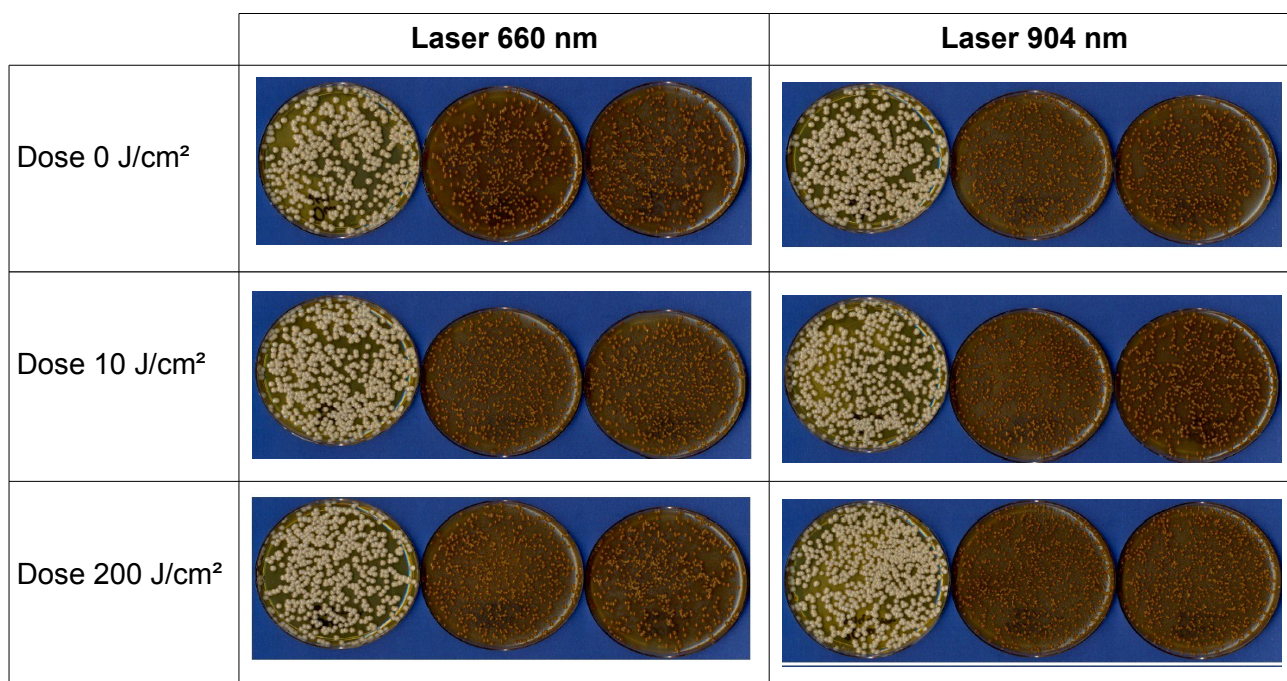
**Figura 1.** Gráficos apresentando *box plots* a porcentagem de colônias viáveis de *Cryptococcus neoformans* após irradiação de 660 nm (A) e 904 nm (B). O eixo y apresenta a viabilidade em relação ao controle (0 J/cm<sup>2</sup>) para cada dose indicada no eixo x (10, 25, 50, 100 e 200 J/cm<sup>2</sup>). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as doses quando comparadas a dose controle (0 J/cm<sup>2</sup>) pelo testes Kruskal-Wallis estão indicadas por estrelas.



### 3.2- Avaliação fenotípica e da virulência, *in vitro* das leveduras pós-tratamento fotodinâmico

#### 3.2.1- Melanina







A síntese de melanina não foi afetada pela irradiação do laser e todas as colônias que cresceram no meio Niger Seed apresentaram pigmentação marrom.



**Figura 2.** Avaliação da capacidade de produzir melanina após irradiação do laser de baixa potencia. Leveduras de *C. neoformans* não irradiadas (controle 0J/cm<sup>2</sup>) e irradiadas (10 e 200 J/cm<sup>2</sup>) plaqueadas em meio YPD sólido e Niger Seed Ágar.

#### 3.2.2- Fosfolipase


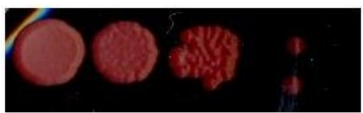
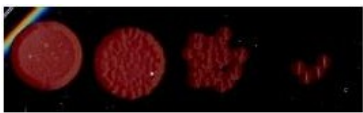

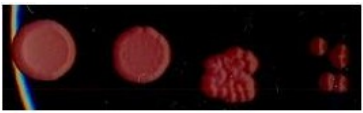
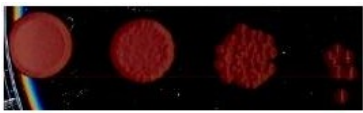

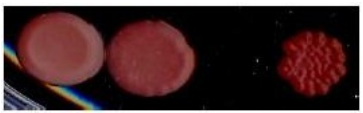

O ensaio para avaliação da produção de fosfolipase, outro fator de virulência bem estudado em *C. neoformans*, após irradiação do laser de baixa potencia, revelou a formação de zona opaca de precipitação ao redor das colônias, para todas as doses e comprimentos de onda empregados. Ao realizar as medidas para o cálculo da razão, encontrou-se uma atividade enzimática fortemente positiva para todas as amostras, inclusive os controles, indicando que o laser não interfere na produção de fosfolipase de *C. Neoformans*.


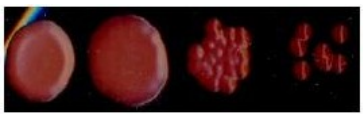
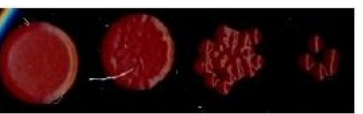

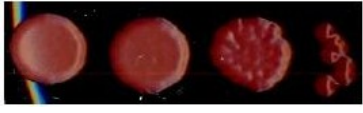
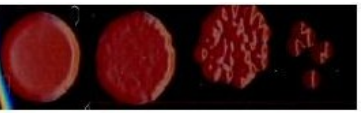

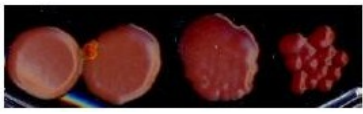

	Laser 660 nm	Laser 904 nm
Dose 0 J/cm <sup>2</sup>	 <p>DMC = 1,23 cm DMCP = 3,1 cm DC/DCP = 0,4</p>	 <p>DMC = 1,17 cm DMCP = 2,67 cm DC/DCP = 0,44</p>
Dose 10 J/cm <sup>2</sup>	 <p>DMC = 1,13 cm DMCP = 2,63 cm DC/DCP = 0,43</p>	 <p>DMC = 1,17 cm DMCP = 2,6 cm DC/DCP = 0,45</p>
Dose 200 J/cm <sup>2</sup>	 <p>DMC = 1,15 cm DMCP = 2,9 cm DC/DCP = 0,4</p>	 <p>DMC = 1,13 cm DMCP = 2,47 cm DC/DCP = 0,46</p>


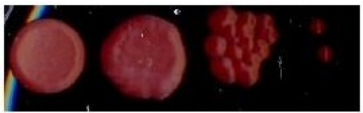
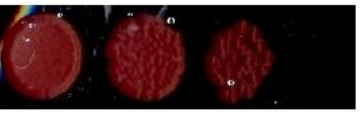

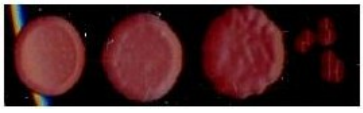
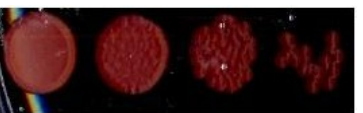

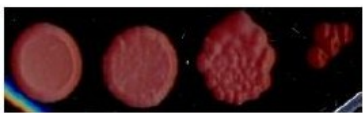
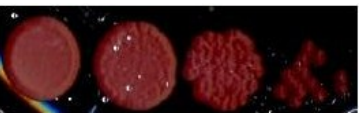
**Figura 3.** Mensuração da atividade enzimática (Pz) da fosfolipase nas leveduras irradiadas com laser de baixa potência de *C. neoformans*. Para cada dose irradiada houveram três pontos de inoculação no meio de cultura e a avaliação da atividade enzimática ocorreu por meio da razão entre o diâmetro médio das colônias (DMC) e o diâmetro médio das colônias mais a zona de precipitação (DMCP).


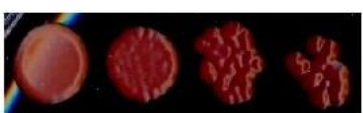
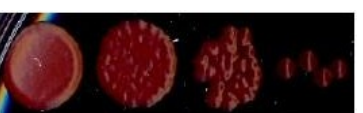

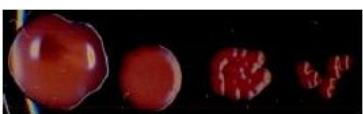



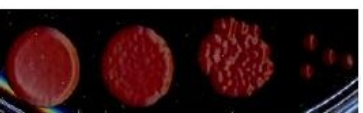
### 3.2.3- Parede Celular

A irradiação do laser não causou dano a parede celular do fungo, sendo que foi observado crescimento normal das leveduras irradiadas em meio de cultura com Congo Red. De maneira conjunta, avaliou-se a capacidade das leveduras crescerem a 37°C em YPD e na presença de Congo Red. Esta característica (capacidade de crescer na temperatura do hospedeiro humano), que também é muito importante para a patogênese do fungo, não foi afetada pelo laser.

<b>A</b>			
<b>660 nm - 30°C</b>			
Dose	YPD	YPD + CR 0,5 %	YPD + CR 1%
200 J			
10 J			
0 J			

<b>B</b>			
<b>660 nm - 37°C</b>			
Dose	YPD	YPD + CR 0,5 %	YPD + CR 1%
200 J			
10 J			
0 J			

<b>C</b>			
<b>904 nm - 30°C</b>			
Dose	YPD	YPD + CR 0,5 %	YPD + CR 1%
200 J			
10 J			
0 J			

<b>D</b>			
<b>904 nm - 37°C</b>			
Dose	YPD	YPD + CR 0,5 %	YPD + CR 1%
200 J			
10 J			
0 J			

**Figura 4.** Avaliação da integridade da parede celular e da capacidade de crescimento a 37° C de leveduras de *C. neoformans* após irradiação com laser de baixa potencia, nos comprimentos de onda 660nm (A e B) e 904 nm (C e D). Para avaliação as leveduras após irradiadas foram diluídas em série e as diluições foram inoculadas em meio YPD, YPD + Congo Red 0,5% e YPD + Congo Red 1%, incubação a 30 e 37°C, por 48-72h.

### 3.3- Avaliação da expressão dos genes envolvidos em sinalização celular, proliferação e estresse oxidativo

Por meio da técnica de PCR em tempo real foi possível avaliar a expressão gênica das leveduras irradiadas com laser de baixa potência. Dentre os genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo avaliados (COX, CAT e SOD) não se observou alteração da expressão gênica, ou seja, o laser não promoveu alterações transcricionais significativas destes genes em nenhuma das condições testadas. É importante ressaltar que ausência de modulação da expressão gênica, não significa que não há estresse oxidativo nas células irradiadas, visto que não foram avaliados outros parâmetros como presença de radicais livres ou aumento da atividade enzimática de enzimas que atuam no controle do estresse oxidativo. A expressão do gene RAS também não foi modulada em nenhuma condição avaliada, ao contrário do gene que codifica a subunidade catalítica da Calcineurina (CNA), que se apresentou significativamente induzido, 4 vezes comparado ao controle, após irradiação de 200J no comprimento de onda de 904nm (Figura 5E).

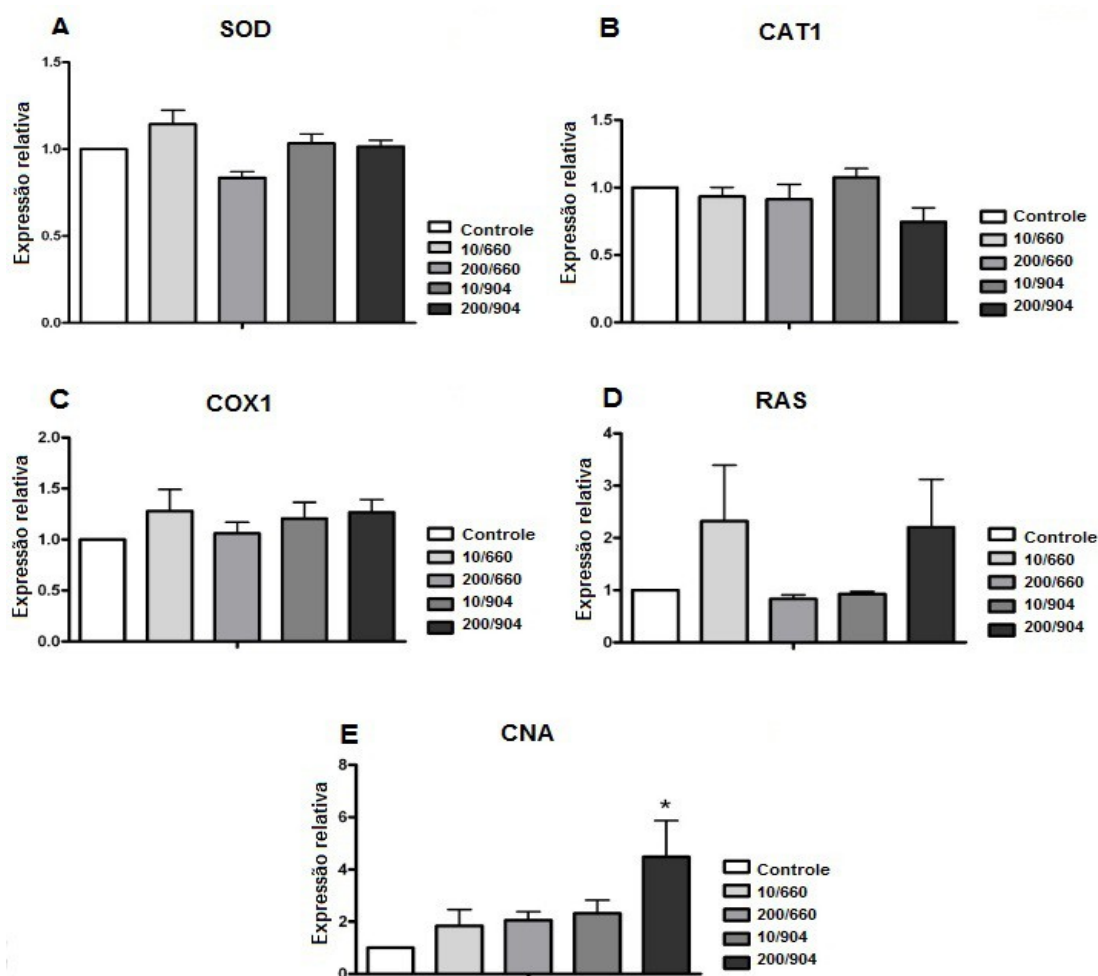


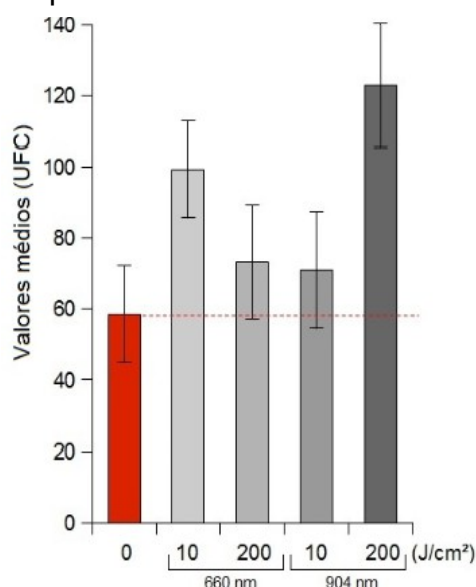
Figura 5. Gráficos apresentando a análise estatística dos valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  referentes à expressão relativa segundo PCR em



tempo real dos genes: Superóxido dismutase (A), Catalase (B), Citocromo c oxidase (C), RAS (D) e Calcineurina (E), tendo como controle interno a actina. Realizou-se análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de Tukey, com nível crítico para significância de  $p < 0.05$ . Apenas os resultados da expressão da calcineurina na dose de 200J e comprimento de onda de 904nm apresentaram este nível de significância.

### 3.4- Efeito do laser sobre macrófagos, antes e após a fagocitose do fungo.

Iniciou-se a pesquisa com a avaliação da interação isolada entre o laser e o fungo. No entanto, sabe-se que numa situação de infecção cutânea o efeito deste recurso terapêutico sofrerá influência das estruturas e tecidos que compõe a região, além das células de defesas recrutadas para o local. Uma importante característica relacionada com a virulência de *C. neoformans* é a sua capacidade de sobreviver no interior de células fagocíticas, neutralizando as espécies moleculares reativas a que está sendo exposto e reparando os danos celulares causados pelo estresse oxidativo e nitrosativo, podendo multiplicar-se e disseminar-se sem a interferência de uma resposta imune. Como forma de aproximar os resultados obtidos por experimentos *in vitro* aos que seriam encontrados *in vivo*, foram incluídos ensaios com macrófagos aos experimentos, para análise do efeito do laser sobre uma condição de resposta imune induzida. A interação do laser com apenas os macrófagos não foi capaz de gerar qualquer alteração, em nenhum dos comprimentos de onda e dosimetrias empregados. Com a irradiação sendo realizada após fagocitose do fungo, as unidades formadoras de colônias (UFC) que foram quantificadas após a incubação representavam as leveduras que sobreviveram à fagocitose. Como observado na figura 6, a irradiação do laser alterou a taxa de morte de *C. neoformans* por macrófagos, sendo que a maior taxa de viabilidade para o fungo foi observada no grupo de células irradiadas por 200J do laser infravermelho (904 nm), cujo valor médio representou mais que o dobro do controle não irradiado.



**Figura 6.** Gráfico comparativo da viabilidade de *C. neoformans* após fagocitose e irradiação de laser em diferentes dosimetrias.

#### 4- DISCUSSÃO

Para que um serviço de saúde seja considerado de qualidade é necessário não somente a disponibilização de recursos como também uma prática clínica eficaz por parte dos profissionais de saúde. Por muito tempo o conhecimento sobre o qual eram formuladas as intervenções em saúde foi baseado na autonomia e experiência clínica. Atualmente, com a evolução do campo científico, o valor da evidência clínica proveniente de investigação sistemática é muito reconhecido e incentivado. A fisioterapia Baseada em Evidências (FBE) é parte integrante de um conceito chamado "Prática Baseada em Evidências" que teve início na medicina e é definido como o uso consciente, explícito e ponderado da melhor e mais recente evidência de pesquisa na tomada de decisões clínicas sobre o cuidado do paciente. Na fisioterapia esse movimento é relativamente recente e algumas condutas em serviço permanecem sem embasamento científico suficiente. Por esse motivo, muitos tem sido os esforços para melhorar a qualidade da assistência e contribuir para uma prática reflexiva baseada em conhecimento científico<sup>27</sup>. Um bom exemplo disso é o uso do laser com objetivo de cura, prevenção de morte tecidual, alívio da dor, redução da inflamação, regeneração tecidual, entre outros<sup>28</sup>. São aplicações reconhecidas devido aos resultados encontrados na prática e que aos poucos vem conseguindo reconhecimento também na literatura científica.

Segundo Aimbire *et al.* os lasers de baixa potência não emitem calor, som ou vibração, mas são capazes de induzir uma reação fotoquímica na célula<sup>29</sup>. Para Karu, o mecanismo de ação envolvido ocorre principalmente nas mitocôndrias, as geradoras de energia da célula eucariótica, sendo que o Complexo IV (citocromo c oxidase) atua como cromóforo, ou seja, absorve a luz. O laser gera então aumento de ATP celular produzido e regula a molécula de AMP cíclico, que está envolvida em muitas vias de sinalização. O laser atua também no metabolismo do oxigênio, cujo subproduto são as espécies reativas de oxigênio, moléculas quimicamente ativas que desempenham um papel importante na sinalização celular, regulação da progressão do ciclo celular, ativação de enzimas e síntese de ácido nucléico e proteínas<sup>30</sup>. No trabalho de Zhang *et al.*, avaliou-se a expressão de genes de fibroblastos humanos irradiados por laser de baixa potência do tipo vermelho (628 nm - 0,88J/cm). Para tanto, utilizou-se da técnica de microarranjos de cDNA e após os experimentos observou-se que a expressão de vários desses genes foi estimulada<sup>31</sup>. Existe uma infinidade de efeitos que ainda não estão totalmente elucidados, mas que vem gerando interesse de um grande número de pesquisadores. Isso se deve a

uma combinação de fatores: o tratamento medicamentoso, em algumas situações clínicas, apresenta eficácia incerta e efeitos adversos incômodos; não existem relatos de efeitos adversos com o tratamento por laserterapia<sup>28</sup>. O que existe são suposições de possíveis efeitos adversos, como o aumento da proliferação de microrganismos pela irradiação do laser.

A utilização de um recurso cicatrizante com efeito proliferativo sobre microrganismos não só agravaria o quadro infeccioso inicial, como também iria contra o objetivo terapêutico de sua utilização. Isso porque, localmente, a infecção é o que causa maior influência no processo de regeneração da pele: Somado ao aumento da lise colágeno, pelo aumento das enzimas lisossomais, ocorre diminuição de sua síntese, pois os fibroblastos passam a competir com outras células e microrganismos por oxigênio e nutrientes, reduzindo o metabolismo local<sup>32</sup>. Isso fundamenta a contra-indicação a partir da hipótese, mas não a confirma.

Várias pesquisas vem demonstrando que o laser terapêutico têm um potencial bactericida significativo e que devido a sua baixa intensidade, pode ser aplicado nos tecidos orais sem causar dano<sup>33</sup>. Sabendo que os microrganismos orais muitas vezes interagem formando comunidades (ou biofilmes) e que essa interação pode ocorrer também entre espécies microbianas diferentes, tais como bactérias e fungos, Basso *et al.* buscou avaliar o efeito da irradiação com laser de baixa intensidade do tipo infravermelho sobre biofilmes formados por *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e associação de ambos. Ele observou que a terapia foi capaz de reduzir o metabolismo celular, número de microrganismos e crescimento do biofilme, sendo que os efeitos não foram os mesmos com os microrganismos associados. Neste caso houve redução na formação de hifas pela *C. albicans* e resistência à fototerapia pelo *S. mutans*<sup>34</sup>.

Alguns estudos abordaram também a utilização desse recurso em feridas causadas por vírus. O melhor exemplo é o herpes simplex (HSV), um vírus que pode causar erupções vesiculares dolorosas e recorrentes. Estes estudos demonstraram que o laser de baixa intensidade é mais eficaz que o aciclovir, anti-viral normalmente empregado nesses casos, eliminando a dor e reduzindo a frequência dos surtos<sup>35</sup>. Carvalho *et. al.* analisaram outras características intrínsecas às lesões e observaram uma redução significativa do tamanho e do edema, quando comparado aos grupos controle, tratados topicamente com aciclovir<sup>36</sup>.

Os efeitos da administração combinada de diferentes comprimentos de onda sobre os tecidos também vêm sendo alvo de estudos. Mendez *et. al.* avaliaram a influência de

diferentes doses e comprimentos de onda na cicatrização de feridas induzidas em modelo experimental e encontraram um efeito comum: Rápido aparecimento e resolução da inflamação local, com redução do tempo de reparo tecidual. Em um dos grupos, combinou-se os lasers de 685 e 830 nm numa dosimetria total de 20J. Nele foram encontrados níveis de proliferação de fibroblastos mais elevados, assim como uma distribuição mais uniforme das fibras de colágeno. Considerou-se que juntos, os dois comprimentos de onda causaram a estimulação de partes superficiais e profundas, beneficiando a relação penetração-absorção pelo incremento da energia residual após a atenuação<sup>37</sup>. Em feridas cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus*, a terapia combinada promoveu uma resolução mais rápida da inflamação e uma expressão mais intensa da matriz de colágeno, beneficiando a maturação e organização das fibras<sup>38</sup>.

Relatos na literatura dos efeitos do laser terapêutico em fungos ainda são escassos. Um dos poucos estudos com relação ao tema avaliou os efeitos da irradiação com laser sobre feridas decorrentes da paracoccidiodomicose (micose causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*) em camundongos. Este estudo demonstrou haver efeitos positivos do laser na cicatrização de feridas em modelo experimental, no qual houve diminuição dos níveis de interleucina pró-inflamatórias (IL) -17, do fator de necrose tumoral- $\alpha$ , e de citocinas anti-inflamatórias (IL 10), entre outros efeitos<sup>39</sup>. A justificativa para tal estudo relacionou-se com o fato de lesões cutâneas causadas por fungos requererem um tratamento com drogas antifúngicas, que geralmente é longo e com efeitos colaterais diversos. Sendo assim, seria de interesse comum estudar os efeitos deste mesmo recurso em lesões cutâneas causadas por outras espécies de fungo, tais como o *C. neoformans*. Esta espécie é a causa mais comum de infecções sistêmicas em pessoas infectadas com HIV<sup>40</sup>, podendo ocorrer também entre pacientes transplantados que estão sob uso de imunossupressores. A manifestação de criptococose cutânea pode ocorrer posteriormente à disseminação hematogênica (criptococose cutânea secundária) ou mais raramente, por inoculação traumática (criptococose cutânea primária)<sup>41</sup>.

Fatores de virulência podem ser definidos como as características que permitem ao microrganismo transpor as defesas do hospedeiro<sup>42</sup>. Os mais bem estabelecidos fatores de virulência em *Cryptococcus* são: termotolerância, parede celular, melanina e cápsula, capacidade de adesão, receptores de hormônios e produção de enzimas<sup>43</sup>. No presente trabalho, avaliamos a produção de melanina, integridade da parede celular, capacidade de crescer à 37°C e produção de fosfolipase. Melaninas são pigmentos hidrofóbicos



carregados negativamente, formados pela oxidação de compostos fenólicos. A maneira pela qual ela contribui para a virulência de microrganismos tem sido extensivamente estudada e parece estar relacionado com a redução da suscetibilidade dos microrganismos aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às agressões ambientais<sup>44</sup>. Encontrar agentes terapêuticos que interfiram com a melanização pode ser uma estratégia potencial para o desenvolvimento de antimicrobianos, daí a importância de se verificar esse efeito em fungos expostos a irradiação de laser. Nos experimentos realizados com meio de cultura adequado para evidenciação deste fator de virulência (Níger Seed ágar), não foi detectado qualquer efeito do laser sobre o fungo, em nenhuma das condições testadas.

Fosfolipases são enzimas hidrolíticas que quebram os fosfolipídeos em suas partes componentes, podendo gerar desestabilização de membrana, lise celular e liberação de mensageiros lipídicos secundários<sup>45</sup>. Cox *et al.* avaliaram a influência desta enzima na virulência de *C. neoformans* e observaram que as atividades enzimáticas foram significativamente reduzidas nos mutantes deletados para o gene que codifica esta enzima, sendo que os mutantes também apresentaram defeito no crescimento no interior de macrófagos<sup>46</sup>. Numa avaliação qualitativa, concluímos que o laser também não exerce influência neste fator de virulência.

A capacidade de crescimento à 37°C, característica intrínseca de um patógeno humano, está envolvida com a manutenção da integridade da parede celular em condições de estresse. A parede celular é uma estrutura que oferece proteção física e apoio osmótico<sup>47</sup>. No fungo, ela funciona como uma estrutura dinâmica cuja composição e organização é regulada durante o ciclo celular e em resposta à mudanças nas condições ambientais e ao estresse<sup>48</sup>. Sobre essa estrutura, o laser não apresentou qualquer efeito deletério, de modo que ela permaneceu intacta após a irradiação e crescimento em meio de cultura rico em *congo red*, um agente desestabilizador da parede celular.

Neste trabalho, avaliou-se a expressão gênica de CNA1, gene que codifica a calcineurina, uma proteína necessária para o crescimento de *C. neoformans* à temperatura elevada. Estirpes mutantes para calcineurina são viáveis, porém não sobrevivem em condições que se assemelham às características do hospedeiro<sup>49</sup>. De todos os genes avaliados, apenas a expressão deste sofreu alteração significativa. As amostras irradiadas por 200J/cm<sup>2</sup> no comprimento de onda de 904nm foram as únicas que induziram o gene de forma significativa com relação a amostra controle (0J) e a actina. Com base no exposto, foi observado que o Laser de Baixa Potência, apesar de

contribuir para a diminuição da viabilidade do fungo em condições controladas (incubação à 30°C), induz a expressão do gene da calcineurina (CNA1), no entanto os mecanismos de sinalização que são ativados posteriormente a esta modulação gênica não são conhecidos. Não foram observadas alterações na expressão do gene que codifica para a proteína RAS, envolvida com proliferação e diferenciação celular<sup>50</sup> e nos genes que codificam enzimas envolvidas no estresse oxidativo (SOD - capaz de converter radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, COX - envolvida na via de fosforilação oxidativa e, assim, na produção de energia e CAT - envolvido com a proteção contra o estresse oxidativo)<sup>51,52,53</sup>.

A capacidade de resistir ao estresse oxidativo é uma das mais importantes características de virulência do fungo, refletindo sua habilidade de lidar com o efeito deletério causado no interior de macrófagos, neutralizando o estresse, reparando danos e, eventualmente, crescendo nesse ambiente. Upadhy *et. al.* realizaram uma análise por microarray das células tratadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em diferentes intervalos de tempo, com o objetivo de identificar uma assinatura transcricional associada com o estresse oxidativo. A sensibilidade dos organismos para diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a magnitude da resposta celular induzida foi altamente dependente da composição do meio no qual as células foram cultivadas. Apesar de as células cultivadas em meio YNB terem apresentado pior resposta ao estresse oxidativo, este foi o meio de cultura escolhido para as análises subsequentes, pois representava um ambiente limitado de nutrientes que mais se assemelhava ao interior de macrófagos. O estudo identificou papéis potenciais da função mitocondrial e ubiquitinação de proteínas na resistência ao estresse oxidativo. A maior adaptação metabólica durante o crescimento dentro do hospedeiro gera aumento da expressão de genes pertencentes a via pentose fosfato e maior produção de NADPH, componente crítico para a reparação de danos oxidativos em leveduras<sup>54</sup>.

Conforme os experimentos inicialmente realizados, o laser não exerce efeito bioestimulador sobre a levedura oportunista *C. neoformans*. O fato de não ter sido observado aumento e sim uma diminuição na proliferação do fungo em decorrência da irradiação do laser representa uma contribuição importante para o acervo de evidências que fundamentam o uso deste recurso na fisioterapia. No entanto, os experimentos adicionais realizados com macrófagos mostram que o laser pode sim exercer efeitos negativos no tratamento de feridas cutâneas infectadas, não por induzir a proliferação de microrganismos, mas por alterar a função das células fagocíticas na destruição desses

microrganismos. É necessária uma investigação mais detalhada sobre os mecanismos de sinalização que são ativados pelo laser de baixa potência no fungo patogênico humano *C. neoformans*, afim de se avaliar o envolvimento da via da calcineurina na resposta ao laser, assim como identificar as alterações provocadas no macrófago infectado que contribuiriam para a redução de sua função fagocítica.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guirro E, Guirro R. Fisioterapia dermato-funcional: fundamentos, recursos e patologias. 3. ed. São Paulo: Manole, 2004
2. Nussbaum E, Baxter GD, Lilge L. A Review of Laser Technology and Light-Tissue Interactions as a Background to Therapeutic Applications of Low Intensity Lasers and Other Light Sources. *Physical Therapy Reviews*, 2003
3. Baxter D. Laserterapia de baixa intensidade. In: Kitchen S, ed. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. 11<sup>a</sup> ed. Barueri: Manole; 2003. p.171-88.
4. Dederich DN, Bushik RD. Lasers in dentistry: separating science from hype. *Journal of the American Dental Association*, Chicago, v. 135, n. 2, p. 204-212, 2004.
5. Almeida-Lopes L. Técnica da Drenagem Linfática Ativada por Laserterapia. In: *Atualização Clínica em Odontologia*, v.1; cap.14; p.327/340, Editora Artes Médicas, São Paulo, 2006.
6. Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizzoto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades - parte 2. *Fisioter Bras*. 2001;2(6):337-52.
7. Cullum N, Nelson EA, Flemming K, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (5) beds; (6) compression; (7) laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy. *Health Technol Assess*. 2001; 5(9): 1-221
8. Rodrigo SM., Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JBB. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2009. 27(6), 929-935.
9. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schoen H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvascular Research*, 2002. 64(2), 240-246
10. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter D. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train*. 2004;39(3):223-9.
11. Rocha JCT. Laser therapy, tissue cicatrization and angiogenesis. 2004, *RBPS* 17: 44-48.
12. Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter GD. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomed Laser Surg*. 2010 Feb; 28(1):3-16
13. Christie A, Jamtvedt G, Dahm K, Moe R, Haavardsholm E, Hagen K. Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for patients with rheumatoid arthritis: an overview of systematic reviews. *Phys Ther* 2007; 87: 1697-715.

14. Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Joensen J, et al. A systematic review with procedural assessments and metaanalysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord* 2008; 9: 75.
15. Bjordal J, Johnson MI, Lopes-Martins RA, Bogen B, Chow R, Ljunggren AE. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8: 51
16. Lau RW, Cheing GL. Managing postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*, 2009. Oct; 27(5):763-9
17. E Lima MT, E Lima JG, de Andrade MF, Bergmann A. Low-level laser therapy in secondary lymphedema after breast cancer: systematic review. *Lasers Med Sci*. 2012 Nov 29
18. Naeser MA, Hahn KA, Lieberman BE, Branco KF. Carpal tunnel syndrome pain treated with low-level laser and microamperes transcutaneous electric nerve stimulation: A controlled study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2002 Jul; 83(7):978-88
19. Nóbrega C, da Silva EM, de Macedo CR. Low-level laser therapy for treatment of pain associated with orthodontic elastomeric separator placement: A placebo-controlled randomized double blind clinical trial. *Photomed Laser Surg*. 2012 Nov 15
20. Migliorati C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, Estilo CL, Hodgson B, Lopes NN, Schubert MM, Bowen J, Elad S. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013; 21:333–341
21. Öz S, Gökçen-Röhlig B, Saruhanoglu A, Tuncer EB. Management of myofascial pain: low-level laser therapy versus occlusal splints. *J Craniofac Surg*. 2010 Nov; 21(6):1722-8
22. Yilmaz HG, Kurtulmus-Yilmaz S, Cengiz E, Bayindir H, Aykac Y. Clinical evaluation of Er,Cr:YSGG and GaAlAs laser therapy for treating dentine hypersensitivity: A randomized controlled clinical trial. *J Dent*. 2011 Mar; 39(3):249-54. Epub 2011 Jan 14
23. Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol*. 2009, 11: 370-80.
24. Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3:753-764.
25. Pau M, Lallai C, Aste N, Aste N, Atzori L. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host. *Mycoses*. 2010; 53: 256-8
26. Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Forrest GN, Lyon GM, et al. Cryptococcal Collaborative Transplant Study Group. Cutaneous cryptococcosis in solid organ transplant recipients. *Med Mycol*. 2010; 48:785-91.

27. Filipin LI, Wagner MB. Fisioterapia baseada em evidências: uma nova perspectiva. *Rev Bras Fisiot.* 2008; 12(5):432-3
28. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *Physical Medicine and Rehabilitation, Suppl. 2*, 2010; S292-S305
29. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24:33–37.
30. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 49:1–17.
31. Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z., Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 120, 849–857.
32. Pinheiro, A.L.B., Meireles, G.C., Carvalho, C.M., et al. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar rats. *Photomed. Laser Surg.* 2006; 24:616–624.
33. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, et al.. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg Med* 1998;22:302-311.
34. Basso FG *et al.* *In Vitro* effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz. Dent. J.* 2011, vol.22, n.6, pp. 502-510.
35. Muñoz Sanchez PJ, Capote Femenías JL, Díaz Tejada A, Tunér J. The Effect of 670-nm Low Laser Therapy on Herpes Simplex Type 1. *Photomed Laser Surg.* 2011 Nov 2.
36. de Carvalho RR, de Paula Eduardo F, Ramalho KM, Antunes JL, Bezinelli LM, de Magalhães MH, Pegoretti T, de Freitas PM, de Paula Eduardo C. Effect of laser phototherapy on recurring herpes labialis prevention: an in vivo study. *Lasers Med Sci.* 2010 May;25(3):397-402.
37. Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento PM, Ramalho LM. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J Clin Laser Med Surg.* 2004 Feb;22(1):19-25.
38. Santos NR, de M Sobrinho JB, Almeida PF, Ribeiro AA, Cangussú MC, dos Santos JN, Pinheiro AL. Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of cutaneous wounds infected by *Staphylococcus aureus*. *Photomed Laser Surg.* 2011 Mar;29(3):177-82
39. Nagib PRA, Gameiro J, Costa TA, Di Gangi R, Ribeiro JS, Paulino LC, Verinaud L. Effect of HeNe Laser Irradiation on Extracellular Matrix Deposition and Expression of Cytokines and Chemokines in Paracoccidioidomycotic Lesions. *Photochemistry and Photobiology*, 2010, 86: 920–924.
40. Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull.* 2005 Apr 18;72:99-

118. Print 2004. Vilchez RA, Irish W, Lacomis J. The clinical epidemiology of pulmonary cryptococcosis in non-aids patients at a Tertiary Care Medical Center. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:308-12.
41. Bivanco FC, Machado CAS, Martins EL. Criptococose cutânea. *Arq Med ABC.* 2006;31(2):102-9.
42. Casadevall, A. & Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998
43. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS Virulence factors in fungi of systemic mycoses *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 40:125-135, 1998
44. Nosanchuk JD , Casadevall Uma , The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Célula Microbiol* 2003 Apr; 5 (4) :203-23.
45. Karp G. *Biologia Celular e Molecular*, 3ª edição, Barueri: Manole, 2005.
46. Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(1):166-75.
47. Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E. and Middelberg, A.P. (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9871^9874.
48. San-Blas, G. and Nino-Vega, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* 165(4-5): 183-95
49. Odom, A., Muir, S.; Lim, E.; Toffaletti, D. D.; Perfect, J. R.; Heiman, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*, 16: 2576-2589, 1997
50. Alspaugh, J. A.; Cavallo, L.M.; Perfect, J. O.; Heitman, J. RAS1 regulates filamentation, mating, and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 36: 352-365, 2000
51. Cox MC, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A, Perfect JR. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun.* 2003 January; 71(1): 173–180.
52. Giles SS, Stajich JE, Nichols C, Gerrald QD, Alspaugh JA, Dietrich F, Perfect JR. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. *Eukaryotic Cell* September 2006 vol. 5 no. 9 1447-1459
53. Toffaletti DL, Poeta MD, Rude TH, Dietrich F, Perfect JR. Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment. *Microbiology* April 2003 vol. 149 no. 4
54. Upadhyaya R, Campbell LT, Donlin MJ, Aurora R, Lodge JK (2013) Global Transcriptome Profile of *Cryptococcus neoformans* during Exposure to Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress. *PLoS ONE* 8(1): e55110