

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PATRÍCIA CAMPI SANTOS

**PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE EM MODELO EXPERIMENTAL DE
INFECÇÃO PULMONAR PELO FUNGO PATOGENICO *Paracoccidioides*
*brasilensis***

BELO HORIZONTE

2011

PATRÍCIA CAMPI SANTOS

**PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE EM MODELO EXPERIMENTAL DE
INFECÇÃO PULMONAR PELO FUNGO PATOGÊNICO *Paracoccidioides
brasiliensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Silva Cisalpino

Co-orientadora

Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza

BELO HORIZONTE

2011

043

Santos, Patrícia Campi.

Papel da 5-lipoxigenase em modelo experimental de infecção pulmonar pelo fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Patrícia Campi Santos. - 2011.

110 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Patrícia Silva Cisalpino. Co-orientadora: Danielle da Glória de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* - Teses. 2. Fagocitose - Teses. 3. Oxido nítrico - Teses. 4. Resposta imune - Teses. 5. Leucotrienos - Teses. 6.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Profa. Daniele da Glória de Souza
Relator e Suplente: Prof. Daniel de Assis Santos

Às 14:00 horas do dia 01 de março de 2011, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pela Profa. Vanessa Pinho da Silva (Departamento de Morfologia/ICB/UFMG), pelo Dr. Frederico Marianetti Soriani (Pós-Doutorado do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG) e a Profa. Patrícia Silva Cisalpino - Orientadora, para julgar o trabalho final "Papel da 5-Lipoxigenase em modelo experimental de infecção pulmonal pelo fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*", da aluna Patrícia Campi Santos, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de março de 2011.

Profa. Vanessa Pinho da Silva Vanessa Pinho da Silva

Dr. Frederico Marianetti Soriani [Assinatura]

Profa. Patrícia Silva Cisalpino (Orientadora) Patrícia Silva Cisalpino

[Assinatura]
Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida, e pela oportunidade de realizar este sonho, dando-me forças e sabedoria nos momentos difíceis. Agradeço por todas as oportunidades que recebi...algumas que soube aproveitar, outras que não soube reconhecer, mas que nem por isso deixaram de ser um aprendizado em minha vida. Às pessoas que colocou de uma maneira muito especial em meu caminho e que contribuíram para essa vitória.

À Professora Patrícia Silva Cisalpino, agradeço imensamente a dedicação, cuidado e paciência com que orientou meus passos. Obrigada pelo aprendizado e confiança em todos esses anos, desde a iniciação científica, incentivando-me, e sempre disposta a abrir muitas portas pra mim. Muito obrigada! Graças a você, hoje me sinto uma pessoa muito mais segura e preparada, em todos os sentidos, para dar continuidade à minha caminhada na vida científica.

À Professora Danielle da Glória, agradeço por toda paciência e auxílio, pela orientação segura e admirável, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho. Obrigada de todo coração por ser essa pessoa alegre e cativante e por ser a responsável pela minha maravilhosa viagem de descobertas pelo imenso universo da imunologia. Por me ensinar a importância da carreira científica e pela orientação que a cada dia contribuiu para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Professor Daniel de Assis, pela colaboração extremamente importante para a realização deste trabalho e, com certeza, de muitos outros que estão por vir. Afinal de contas, bastou você chegar e tudo começou a dar certo! Sempre pronto a ajudar e ensinar. Obrigada por acreditar em mim e no meu potencial.

Aos meus queridos pais Eliane e Camilo, exemplos de garra e honestidade. Apesar de todos os meus defeitos vocês sempre me colocaram no topo de um altar, e me mostraram que os meus grandes sonhos devem estar sempre em primeiro lugar. Graças a vocês, me tornei uma pessoa de bem e aprendi a ser uma grande guerreira, nunca desistindo de buscar a felicidade. Amo muito vocês.

Aos meus queridos irmãos, Adriano, Anderson e Camila, que sempre me deram muita força e incentivo em todas as minhas decisões.

Às minhas carinhosas sobrinhas, Dudinha, Mayara e Kyara, pelos sorrisos angelicais que iluminam a minha vida e por serem tão amáveis com a Titia Paty!! Ao mais novo membro da família, Benício, que chegou para trazer mais alegrias para nossas vidas.

Aos meus dois grandes amigos Antoniel e Marcos, pela amizade, pelos momentos garantidos de descontração e risos nos sábados à noite e por todas

as vezes que estamos juntos, porque é nessas horas que me sinto amada e querida por pessoas verdadeiras e maravilhosas. Vocês são um presente de Deus na minha vida!!

À minha grande amiga Vanessa, pela nossa afinidade que nasceu ainda nos tempos de cursinho e que permanece firme até hoje, embora tenhamos seguido por caminhos totalmente diferentes, você pelo Turismo/Geografia e eu pela Biologia. Mas nem isso foi capaz de desfazer essa nossa maravilhosa amizade.

À Rosana e Mila, verdadeiras amigas presentes durante todo esse tempo no laboratório. Pessoas muito mais do que queridas, que sempre estiveram ao meu lado e que me ajudaram, tanto na vida profissional como na pessoal, me ensinando a crescer e tornando a minha caminhada nessa vida mais divertida e cheia de alegrias. Vocês são um exemplo para mim. Obrigada por me fazerem acreditar que ainda vale a pena fazer pesquisa.

As minhas sempre companheiras e amigas, Betânia, Ludmilla, Marina, Silvinha e Carol, pelo incentivo e por acreditar na minha capacidade. Vocês são ótimas, meninas...é muito bom saber que tenho vocês por perto. Obrigada pelos momentos de alegria e descontração que sempre fazem parte do nosso dia-a-dia.

À Prof.^a Sueli, meu agradecimento muito especial pelo incentivo e carinho em todos esses anos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório LIMHO, Marco Aurélio, Fernanda, Suzana, Nívea, Celso, Raquel, Renata, Milene, Zélia, Vivian, Caio, Flávio, Lívia, Daniel Cisalpino, Ana Carol, Deborah, Andréia, Elizão, Irla, Lucas, Fernando, que sempre estiveram dispostos a ajudar, pelas experiências e ensinamentos transmitidos e por tornar os dias no lab mais divertidos.

Em especial ao Talles, pela essencial ajuda com a histologia, análise das lâminas e pela boa vontade em ajudar sempre....com certeza e merecidamente, o "T helper" de todos...

Em especial ao Thiago, por ter sido meu braço direito com os experimentos de ROS, pelas idéias brilhantes e contribuições para este trabalho.

Àqueles que já deixaram sua marca no lab, Alexandra, Anne, Lucienne, Marjorie, por terem me recebido com tanto carinho em suas bancadas para trabalharmos juntas e por serem as responsáveis pelos meus primeiros passos na iniciação científica e pelas descobertas que fizemos juntas; sem esquecer também da Natália, Roberta(s) e Graciela, que estiveram comigo logo no início de tudo, pela amizade, conselhos e por deixarem valores preciosos em minha vida.

À nossa queridíssima técnica Gilvânia...ou melhor, Gil, pela constante ajuda, dedicação e pelo suporte às atividades gerais do laboratório, o que contribui e muito para a realização do trabalho de todos. Mas acima disso, pela simples presença, porque você é a alegria do nosso laboratório.

RESUMO

A paracoccidiodomicose é uma doença crônica granulomatosa humana causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que acomete, principalmente, indivíduos adultos do sexo masculino. É a micose mais prevalente na América Latina, ocorrendo principalmente no Brasil, Colômbia e Venezuela. A infecção natural ocorre pela inalação de conídios presentes no ambiente, sendo o pulmão o principal órgão acometido. A PCM apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e a gravidade da doença está relacionada ao padrão de resposta imune do hospedeiro. Leucotrienos são mediadores inflamatórios derivados do metabolismo do ácido aracônico pela via da 5-lipoxigenase (5-LO). São descritos como agentes quimiotáticos e reguladores da atividade antimicrobiana de células do sistema imune inato, tendo papel protetor contra diferentes agentes microbianos. Porém, existe uma escassez de estudos relacionados ao papel da enzima e de seus subprodutos na PCM. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da enzima 5-lipoxigenase na regulação da resposta imune à infecção com *P. brasiliensis in vivo* e *in vitro*. Utilizando animais selvagens (WT) e deficientes na produção da enzima 5-LO (5-LO^{-/-}) infectados com *P. brasiliensis*, foram avaliados os seguintes parâmetros imunológicos *in vivo*: letalidade, infiltrado celular, carga fúngica, atividade de mieloperoxidase (MPO) e produção de citocinas. *In vitro*, foram utilizadas ferramentas farmacológicas para avaliar a fagocitose, atividade fungicida, produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) após infecção de macrófagos com leveduras de *P. brasiliensis*. Os resultados obtidos mostram que a ausência de 5-LO resultou na morte de 100% dos animais. Além disso, a infecção de animais 5-LO^{-/-} com *P. brasiliensis* resultou em elevada concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e quimiocinas (CXCL-1/KC e CXCL-2/MIP-2) pró-inflamatórias; alteração no recrutamento de neutrófilos; aumento na atividade de MPO e proliferação fúngica nos pulmões, quando comparados a camundongos selvagens. *In vitro*, houve redução da fagocitose e na atividade fungicida de macrófagos tratados com o inibidor da enzima e infectados com leveduras de *P. brasiliensis*. Observou-se também uma diminuição na concentração de NO e ROS, após tratamento dos macrófagos com inibidor da 5-LO e antagonistas dos receptores para os produtos metabólicos da enzima. Assim, conclui-se que a produção de mediadores lipídicos pela enzima 5-LO tem papel importante nos mecanismos efetores da resposta imune e na defesa do hospedeiro contra infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose, 5-lipoxigenase, leucotrienos, resposta imune, fagocitose, óxido nítrico.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a human chronic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which affects predominantly adult males. It is the most prevalent mycosis in Latin America, occurring primarily in Brazil, Colombia and Venezuela. Natural infection occurs by inhalation of conidia present in the environment, and lungs are the main organ involved. PCM presents a broad spectrum of clinical manifestations, and disease severity is related to the pattern of host immune response. Leukotrienes are inflammatory mediators derived from arachidonic acid metabolism via the enzyme 5-lipoxygenase (5-LO). They are described as chemotactic agents and regulators of the antimicrobial activity of innate immune cells, and protective role against different microbial agents. However, there is an absence of data regarding to the role of the enzyme and its products in PCM. In this study, we evaluated the role of the enzyme 5-lipoxygenase in regulating the immune response after infection with *P. brasiliensis* *in vivo* and *in vitro*. Using wild-type (WT) and 5-LO-deficient mice (5-LO^{-/-}) infected with *P. brasiliensis*, we evaluated the following immunological parameters *in vivo*: lethality, cellular infiltration, fungal load, myeloperoxidase activity (MPO) and cytokine production. *In vitro*, we used pharmacological tools to assess phagocytosis, fungicidal activity, and concentration of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) after infection of macrophages with yeast cells of *P. brasiliensis*. The results show that the absence of 5-LO resulted in the death of 100% of animals. Furthermore, infection of 5-LO^{-/-} mice with *P. brasiliensis* resulted in elevated concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and chemokines (CXCL-1/KC and CXCL-2/MIP-2); imbalance in the recruitment of neutrophils, increased MPO activity and fungal proliferation in the lungs when compared to WT mice. *In vitro*, were observed a decreased phagocytosis and fungicidal activity of macrophages treated with 5-LO inhibitor and infected with yeasts of *P. brasiliensis*. Also, was observed decreased concentration of NO and ROS after treatment of macrophages with inhibitors of 5-LO and antagonists of 5-LO metabolic products. Thus, the production of lipid mediators by the enzyme 5-lipoxygenase may play a role in the effector mechanisms of the immune response and in host defense against *P. brasiliensis* infection.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, 5-lipoxygenase, leukotrienes, immune response, phagocytosis, nitric oxide.