

ESTUDO DO PAPEL DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS) NA INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV).

Mileni Soares Machado¹, Bárbara Nery Porto² (orientador)

¹ Faculdade de Biociências, PUCRS, Brasil.

² Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS, Brasil.



UFRGS PROPEAQ XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CS - Ciências da Saúde

INTRODUÇÃO

A bronquiolite aguda é a doença respiratória mais frequente em crianças nos primeiros anos de vida. Aproximadamente 30 em cada 1000 crianças hospitalizam por bronquiolites em todo o mundo (Stein, 2008). A infecção por RSV (do inglês Respiratory Syncytial Virus, ou, Vírus Sincicial Respiratório) é a principal causa da bronquiolite viral e da pneumonia em todo o mundo, infectando acima de 50% das crianças no primeiro ano de vida e cerca de 100% das crianças de até três anos de idade (Mejias, et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram a cada ano, em todo o mundo, 4 milhões de mortes de crianças abaixo dos 5 anos de idade por infecção respiratória causada por RSV (Garenne, et al., 1992). O RSV é um vírus envelopado, com RNA fita simples negativa e codifica 11 proteínas, entre elas a proteína de fusão (F), caracterizada por mediar a fusão entre o vírus e a superfície da célula-alvo, promovendo a formação do sincício (Bueno, et al., 2008).. As Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) são formadas pela liberação do conteúdo nuclear dos neutrófilos no espaço extracelular. Elas são fundamentais para impedir a disseminação de microrganismos, que são mortos pelas proteínas antimicrobianas que ficam ancoradas nas redes de DNA, como elastase e mieloperoxidase (Papayannopoulos e Zychlinsky, 2009).

METODOLOGIA

Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis e estimulados ($2 \times 10^6/\text{mL}$) com a proteína F ($1 \mu\text{g/mL}$), LPS (100 ng/mL), PMA (25 nM) ou somente meio por 3h a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com Hoechst 33342 (1:2000). As imagens foram avaliadas em microscópio de fluorescência. As NETs também foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas usando o Kit Quant-iT dsDNA HS (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

RESULTADOS

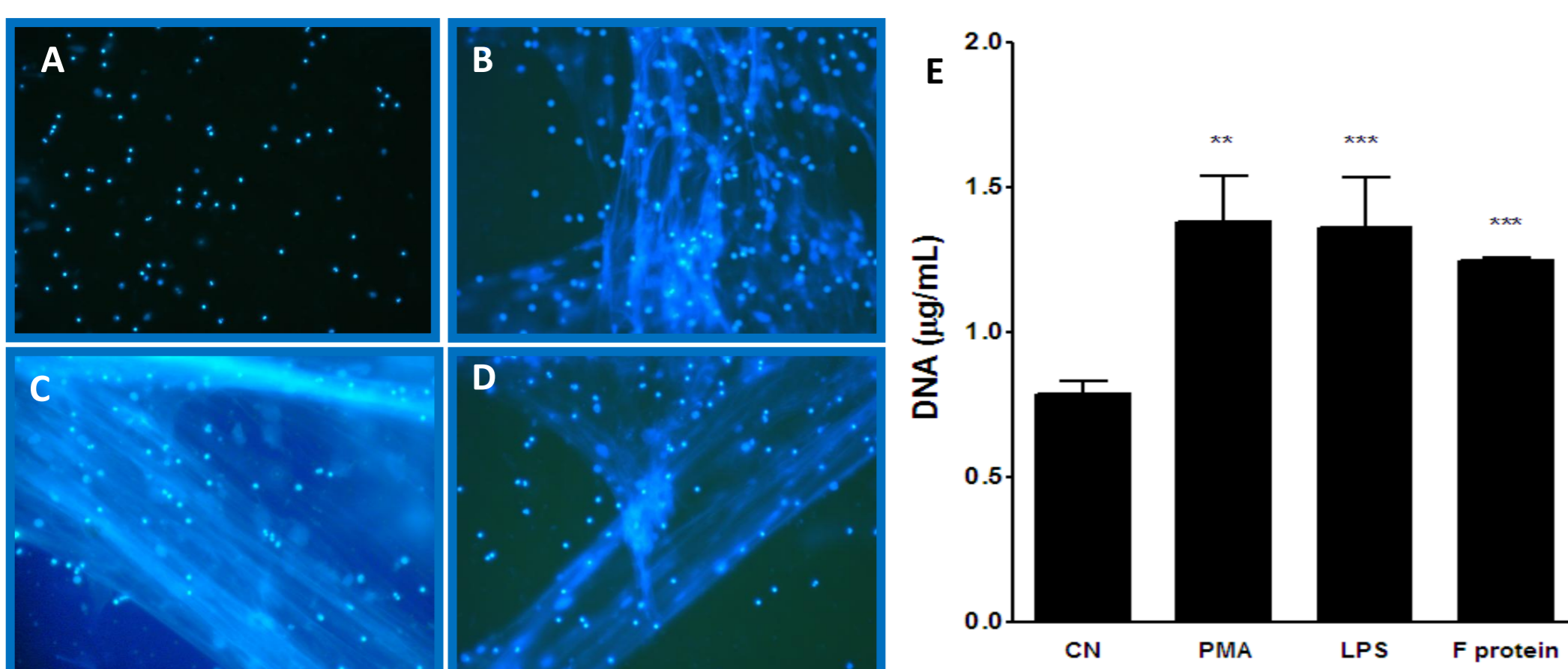


Fig. 1. A proteína de Fusão do RSV é capaz de induzir a formação de NETs. Neutrófilos Humanos ($2 \times 10^6/300 \mu\text{L}$) foram estimulados com meio de cultura (A), LPS (100 ng/mL) (B), PMA (100 nM) (C) ou proteína F do RSV ($1 \mu\text{g/mL}$) (D) por 3 h à 37°C com 5% CO_2 . Células foram então fixadas e coradas com Hoechst 33342 (1:2000). Imagens foram obtidas através de um microscópio de fluorescência. (E) Neutrófilos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram estimulados como descrito acima por 1h à 37°C com 5% CO_2 . Posteriormente, enzimas de restrição foram adicionadas à cultura, que foram mantidas por 2h à 37°C com 5% CO_2 . A formação de NETs foi quantificada no sobrenadante da cultura usando o Kit Quant-iT dsDNA HS. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado com o controle negativo (CN).

Fig. 2. A proteína de F do RSV induz a produção de NETs de uma maneira dependente de concentração. Neutrófilos humanos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram estimulados com a proteína F do RSV ($0,1 - 5 \mu\text{g/mL}$) ou PMA (100 nM) por 1h à 37°C com 5% CO_2 . Posteriormente, enzimas de restrição foram adicionadas à cultura, que foram mantidas por 2h à 37°C com 5% CO_2 . A formação de NETs foi quantificada usando o Kit Quant-iT dsDNA. * $p < 0.05$ comparado com o controle negativo (CN).

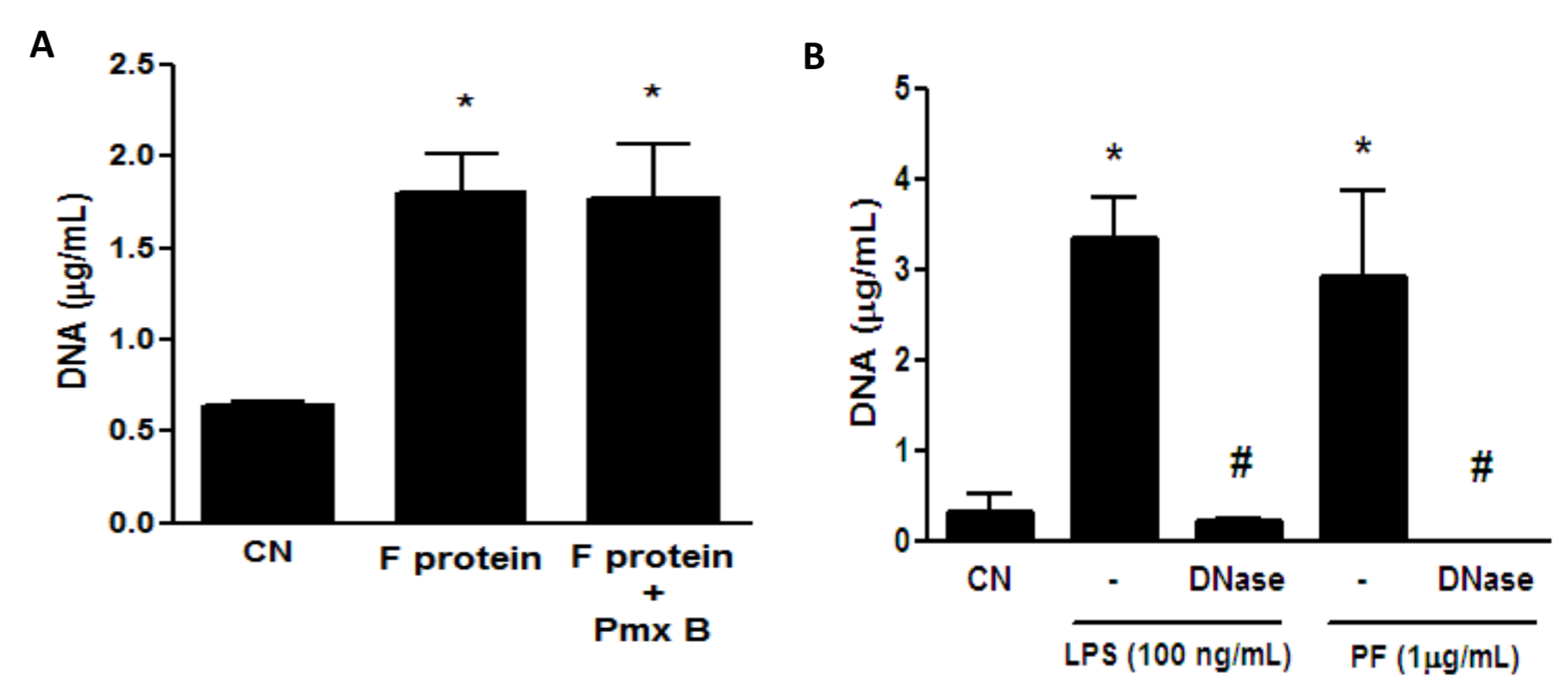
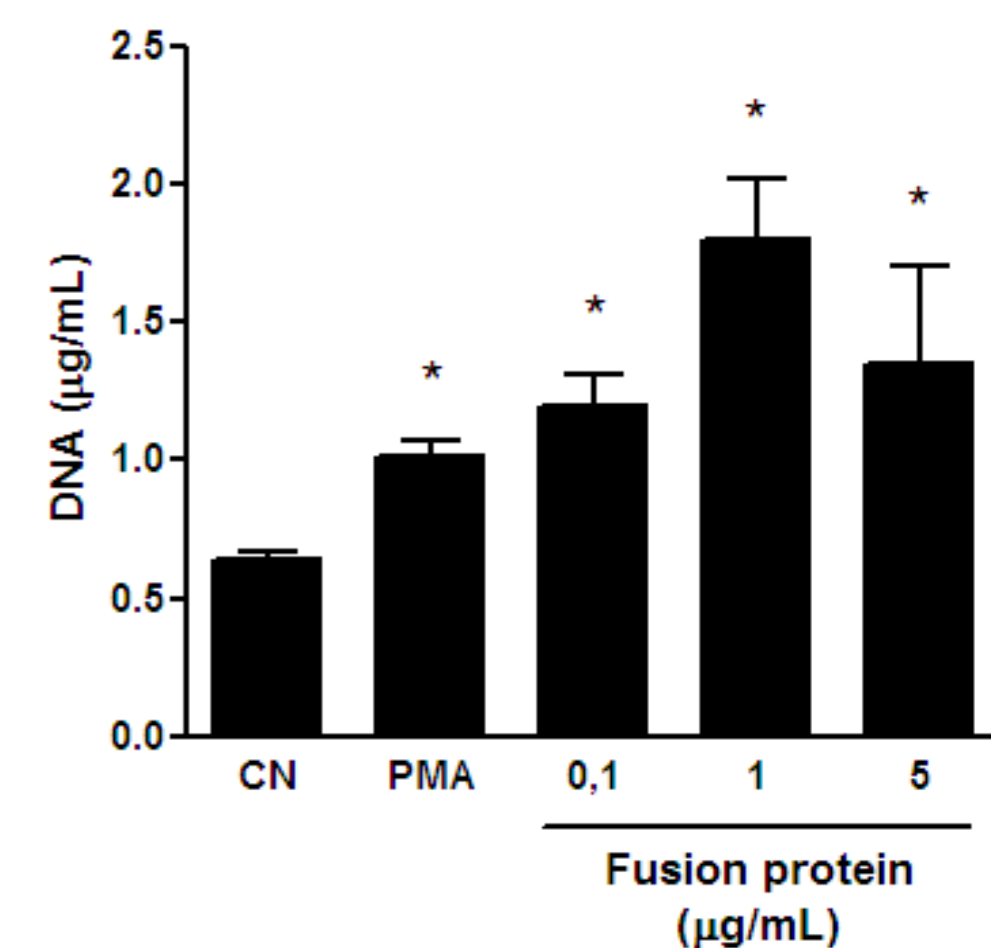


Fig. 3. Efeito do tratamento com Polimixina B ou Dnase na formação de NETs induzidas pela proteína F do RSV. Neutrófilos humanos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram estimulados com a proteína F do RSV ($1 \mu\text{g/mL}$) (A) na presença ou na ausência de Polimixina B (*Pmx B*, $1 \mu\text{g/mL}$). Também foram tratados ou com LPS (100 ng/mL) (B) ou proteína F ($1 \mu\text{g/mL}$) na presença ou ausência de Dnase-1 (100 U/mL) por 1h à 37°C com 5% CO_2 . Posteriormente, enzimas de restrição foram adicionadas à cultura, que foram mantidas por 2h à 37°C com 5% CO_2 . A formação de NETs foi quantificada no sobrenadante da cultura usando o Kit Quant-iT dsDNA. * $p < 0.05$ comparado com controle negativo (CN); # $p < 0.05$ comparado com o tratamento somente com LPS ou proteína F.

CONCLUSÃO

Esses resultados indicam que a proteína F do RSV é capaz de induzir a produção de NETs. Avaliaremos futuramente o papel do receptor TLR-4 na formação das NETs induzida por esta proteína. O excesso da produção de NETs nos pulmões de crianças com bronquiolite viral causada por RSV pode acabar piorando a patologia, já que o DNA das armadilhas pode causar dano tecidual, juntamente com as proteases presentes nas NETs.

REFERÊNCIAS

- Stein, R. T. 2008. Early-life viral bronchiolitis in the causal pathway of childhood asthma: is the evidence there yet? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178(11): 1097.
- Mejias, A, et al. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. *Pediatr Infect Dis J.* 2005, Vol. 24, pp. 189-96. discussion S96-7.
- Garenne, M., C. Ronsmans, H. Campbell. 1992. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Stat. Q.* 45(2-3): 180.
- Bueno, S M, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 2008, Vol. 8, p. 1320.
- Papayannopoulos, V. e A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30(11): 513.



MODALIDADE DE BOLSA

BPA/ PUCRS