



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	A proteína de Fusão do Vírus Sincicial Respiratório induz a formação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs)
Autor	MILENI SOARES MACHADO
Orientador	BÁRBARA NERY PORTO
Instituição	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Bronquiolite aguda é a doença respiratória mais frequente em crianças nos primeiros anos de vida, sendo que a maioria é diagnosticada com infecção respiratória por vírus. O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é caracterizado por não provocar uma resposta imune duradoura e isto implica em grandes chances de ocorrer uma reinfecção, sendo um grande problema em hospitalizações e custos para o sistema de saúde. 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. A proteína F é reconhecida por receptores do tipo Toll (TLRs), promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Diversas quimiocinas e citocinas são encontradas no lavado nasal de crianças com bronquiolite.

As Redes extracelulares de neutrófilos (NETs) são formadas pela liberação do conteúdo nuclear dos neutrófilos no espaço extracelular. As NETs 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. Este projeto pretende caracterizar o efeito da proteína F do Vírus Sincicial Respiratório sobre a geração de NETs.

Os neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores voluntários sadios e foram estimulados ($2 \times 10^5/300 \mu\text{L}$) com a proteína F ($1 \mu\text{g/mL}$), LPS (100ng/mL , PMA (25nM) ou meio sozinho 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. Alternativamente, as NETs foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas usando o Kit Quant-iT dsDNA HS (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Observamos que a proteína F do RSV foi capaz de induzir a formação de estruturas fibrosas, compatíveis com a estrutura das NETs, conforme visualizado por microscopia de fluorescência. De maneira semelhante, o LPS e o PMA também induziram a formação de tais estruturas. Através da quantificação do DNA, pudemos observar que a proteína F estimulou a produção de NETs, de maneira dose-dependente, com a concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ induzindo a melhor resposta. A composição de DNA nas NETs foi confirmada pela incubação dos neutrófilos com DNase, sendo que este tratamento aboliu o efeito da proteína F sobre a formação de NETs. Além disso, para descartar que o efeito da proteína F seja devido à contaminação com LPS, os neutrófilos foram estimulados com a proteína F na presença ou ausência de polimixina B. A proteína F sozinha foi capaz de induzir a formação de NETs e a incubação da polimixina B com a proteína F não afetou a produção de NETs induzida pela mesma. Esse resultado indica que o efeito da proteína F sobre a produção de NETs não é devido a contaminação com LPS. Atualmente, estamos avaliando o papel do receptor TLR-4 na formação de NETs induzida pela proteína F do RSV.

Apoio Financeiro: CNPq, FAPERGS, CAPES, PUCRS.