

Formação de Redes Extracelulares de Eosinófilos (EETs) em Modelo Experimental Murino de Asma

Tássia Rezende de Souza, Paulo Márcio Condessa Pitrez

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Laboratório de Respirologia Pediátrica.

Resumo

A asma é uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável do fluxo aéreo. A formação de redes extracelulares de eosinófilos (EETs) tem sido descrito como um novo mecanismo da resposta imune inata contra as infecções. Entretanto, os mecanismos exatos para sua formação e seu papel na fisiopatologia de algumas doenças, como na asma, não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo foi verificar a formação de EETs no lavado broncoalveolar (LBA) de animais submetidos a um modelo de asma. Foram utilizados 12 camundongos BALB/c provenientes do Vivário do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle negativo em que os animais receberam apenas DPBS (n=6) e outro grupo em que os animais foram submetidos ao modelo de asma através de duas sensibilizações (dias 0 e 7) por via subcutânea com 10 µg de ovalbumina (OVA) seguidos de três desafios intranasais com OVA (50 µg) nos dias 14, 15 e 16 do protocolo (n=6). No 17^o dia os animais foram sacrificados e o LBA foi coletado através da injeção e aspiração de 1 mL de RPMI através de cânula intratraqueal. O LBA foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para verificarmos a liberação das EETs através da quantificação do DNA extracelular. O precipitado foi ressuscitado com RPMI para a contagem diferencial de células e avaliação da formação de EETs por imunofluorescência. Para a visualização da formação das EETs, as células obtidas no LBA (1×10^5) foram plaqueadas em lâminas para cultura de células e incubadas a 37°C com 5% de CO₂, por 1 hora e posteriormente estimuladas com PMA (50 µM). Os eosinófilos foram fixados com paraformaldeído 4%, incubados com o corante de DNA, Hoechst 33342, e as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência. A quantificação do DNA extracelular foi mensurada através de um kit dsDNAHS (Invitrogen®, USA). Os animais do grupo OVA apresentaram um aumento significativo na quantidade de DNA extracelular presente no LBA ($P < 0,01$) e um aumento do percentual de eosinófilos (70%) quando comparado ao grupo controle. A análise por imunofluorescência demonstrou que os animais submetidos ao protocolo de asma apresentaram formação de EETs quando comparados ao controle. Este é o primeiro trabalho experimental que demonstra que na asma ocorre a formação das EETs. Acreditamos que a produção excessiva de EETs possa contribuir para os danos característicos presentes nos pacientes asmáticos.

Palavras-chave: asma, redes extracelulares de DNA, eosinófilos