

AÇÃO MODULATÓRIA DO PEPTIDEOGALACTOMANANA DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* SOBRE REDES EXTRACELULARES EMITIDAS POR HETERÓFILOS DE GALINHA

Caroline Muniz Cunha Rodrigues ¹; Phillipe de Souza Lima Gomes ²; Rosa Maria Tavares Haido ³ & Maria das Graças Miranda Danelli ⁴

1. Bolsista PIBIC, Discente do Curso de Medicina Veterinária, IV/UFRRJ; 2. Discente do Curso de Farmácia, Faculdade de Farmácia/UFRJ; 3. Professora do CCBS/Instituto Biomédico/UNIRIO; 4. Professora do DMIV, IV/UFRRJ.

Palavras-chave: Peptideogalactomanana; *Aspergillus fumigatus*; Redes extracelulares.

Introdução

A aspergilose é a principal enfermidade micótica das aves, sendo o *Aspergillus fumigatus* a principal espécie envolvida (BEERNAET et al., 2010). Apesar de importante, são poucos os estudos sobre a resistência das aves contra essa infecção, e tão pouco se sabe sobre o papel dos heterófilos na aspergilose aviária e seus mecanismos microbicidas. A emissão de redes extracelulares (ETs), compostas por um arcabouço de DNA e proteínas antimicrobianas e histonas, por neutrófilos de mamífero vem sendo descrita na literatura como um mecanismo microbicida capaz de matar diversos patógenos, dentre eles o *A. fumigatus* (SARAIVA et al., 2012). Chaummitri et al. (2009) demonstram a capacidade dos heterófilos de galinhas em emitir ETs quando estimuladas por peróxido de hidrogênio. Nosso estudo teve como objetivo avaliar se a Etose é um mecanismo de morte importante nas infecções por *A. fumigatus* em galinhas e se o peptídeogalactomanana (pGM), extraído do micélio desse fungo, teria papel modulador na emissão das ETs.

Metodologia

Os heterófilos foram obtidos a partir do sangue periférico de pintos Rhode de 3 dias de idade (CEUA/IV/UFRRJ n. 013/2014). Os conídios de *A. fumigatus* (cepa DMIV2012026), foram obtidos a partir da lavagem do tubo de cultivo em Agar Sabouraud com solução de NaCl (0,85%)/Tween 80 (0,5%). O lavado foi centrifugado a 2000 rpm/10 minutos a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em solução salina (NaCl 0,85%) e o número de conídios contados em hemocítômetro. A fração de pGM liofilizada foi obtida conforme descrita por Haido et al. (1998). Para uso, o líofilo foi diluído em água apirrogênica, alicotado e congelado a -20 °C.

A metodologia do trabalho consistiu em cultivar heterófilos purificados segundo Zhou et al. (2013) em placas para cultura de 24 cavidades ou sobre lamínulas de vidro (WARDINI et al., 2010). As células foram estimuladas por 120 minutos/41 °C com peróxido de hidrogênio (1 mM), *A. fumigatus* (1:10) ou pGM (10 µg), com ou sem DNase (1 U/ml, Thermo Scientific). As lamínulas com heterófilos estimulados com peróxido de hidrogênio e *A. fumigatus* foram coradas por corante hematológico (kit Panótico Rápido/Laborclin) e a quantificação das redes formadas nas cavidades das placas foi obtida através do Kit PicoGreen dsDNA (Invitrogen) de acordo com a recomendação do fabricante. O Índice de liberação de ET-DNA foi calculado segundo a fórmula: *Índice de liberação de ET-DNA = DNA estimulado/DNA não-estimulado*, onde o DNA foi a quantidade média de conteúdo de DNA liberado a partir das células ensaiadas. A capacidade fungicida das ETs foi avaliada estimulando-se os heterófilos com o fungo (1:10), na presença de inibidor da fagocitose (10 µg/ml Citocalasina D, Sigma). Após 120 minutos de incubação a 41°C, as placas foram centrifugadas (2000 rpm/5 minutos) e os sobrenadantes das cavidades retirados. Em seguida, foi adicionado às cavidades da placa, caldo Sabouraud (Merck) para propiciar o crescimento do fungo. As placas foram incubadas a 34 °C/22 horas, sendo posteriormente os conídios contados em hemocítômetro. O teste *t Student* foi utilizado como teste de significância entre dois grupos e o ANOVA para comparação acima de dois grupos. A comparação das médias foi realizada com no mínimo três

experimentos independentes, sendo o valor de p considerado significativo quando menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

Resultados e Discussão

O *A. fumigatus* foi capaz de estimular a emissão de ETs pelos heterófilos de galinha, evidenciando-se filamentos corados em rosa pelo corante hematológico, quando os heterófilos foram estimulados com peróxido de hidrogênio (controle positivo) e o fungo. A quantificação das ETs, realizada através da dosagem do DNA, mostrou aumento significativo do índice de ETs-DNA dos heterófilos estimulados, em comparação com heterófilos não estimulados. Tanto o mecanismo de ETose quanto o de fagocitose foram capazes de diminuir a sobrevivência do *A. fumigatus* em mais de 60% após 120 minutos de incubação. Quando eliminamos ambos os mecanismos de morte, através da adição de Citocalasina D (fagocitose) e DNase (etose), a sobrevivência aumenta cerca de 80%, sugerindo que tanto a fagocitose quanto a etose são importantes na eliminação do *A. fumigatus* por heterófilos em galinhas. O pGM foi capaz de estimular a emissão das ETs com a mesma intensidade observada para o fungo íntegro.

Conclusão

Heterófilos de galinhas estimulados pelo *A. fumigatus* são capazes de emitir redes extracelulares (ETs) semelhantes às emitidas por neutrófilos de mamíferos. O mecanismo de etose é, aparentemente, um mecanismo de morte tão importante quanto o mecanismo de fagocitose para o *A. fumigatus*. O pGM modula de forma positiva a emissão das ETs.

Referências Bibliográficas

- BEERNAERT, L.A. et al. *Aspergillus* infections in birds: a review. Avian Pathol., v.39: 325-331, 2010.
- CHAUAMMITRI, P. et al. Veterinary Immunology and Immunopathology v. 129: 126–131, 2009.
- GUIMARÃES-COSTA, A.B. et al. Etosis: a microbicidal mechanism beyond cell death. Journal Parasitology Research. V. 2012, Article ID 929743, p.11 doi:10.1155/2012/929743
- HAIDO, R. M. T. et al. Analysis of peptideogalactomannans from the mycelial surface of *Aspergillus fumigatus*. Medical Mycology, Inglaterra, v. 36: 313-321, 1998.
- WARDINI, A. B.** et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. Journal of General Virology, v. 91: 259-264, 2009.
- ZHOU, Z. et al. Upregulation of chicken TLR4, TLR15 and MyD88 in heterophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Eimeria tenella* in vitro. Experimental Parasitology v. 133: 427–433, 2013.

Agência de Fomento: FAPERJ