



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Bruno Rafael Pereira Lopes

**Avaliação in vitro da ação de enzimas
oriundas das NETs na replicação viral do
hRSV**

São José do Rio Preto

2021

Bruno Rafael Pereira Lopes

**Avaliação in vitro da ação de enzimas oriundas das
NETs na replicação viral do hRSV**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^{fa}. Dr^a Karina Alves de Toledo

São José do Rio Preto

2021

L864a Lopes, Bruno Rafael Pereira
 Avaliação in vitro da ação de enzimas oriundas das
 NETs na replicação viral do hRSV / Bruno Rafael Pereira
 Lopes. -- São José do Rio Preto, 2021
 194 p. : il., tabs., fotos

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas,
 São José do Rio Preto
 Orientadora: Karina Alves de Toledo

 1. hRSV. 2. Neutrófilos. 3. Agentes antivirais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Bruno Rafael Pereira Lopes

Avaliação in vitro da ação de enzimas oriundas das NETs na replicação viral do hRSV

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Karina Alves de Toledo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Cleni Mara Marzocchi Machado
USP – Universidade de São Paulo

Prof^ª. Dr^ª. Barbara Nery Porto
PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof^ª. Dr^ª. Ligia Carla Faccin Galhardi
UEL – Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
UEL – Universidade Estadual de Londrina

São José do Rio Preto
5 de Março de 2021

Dedico essa tese à

Minha família, minha orientadora e aos colegas de trabalho pela força e apoio nos momentos difíceis.

Agradecimentos

A Deus, pela sabedoria, pela paciência e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

À minha família, pelo apoio incondicional, carinho e alegrias.

À minha orientadora, que sempre esteve atenta ao desenvolvimento do projeto, comemorando cada conquista obtida.

Aos colegas de trabalho, pela ótima convivência e auxílio imprescindível.

Ao IBILCE e a todos funcionários da seção de pós-graduação em Microbiologia que sempre me ajudaram, em especial a Prof.^a Dra. Eleni Gomes.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 – Processo: 88882.434469/2019-01.

Resumo

As infecções do trato respiratório são extremamente comuns sendo, o Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) o principal agente etiológico das infecções virais agudas do trato respiratório inferior, resultando mundialmente em mais de 3 milhões de casos muito graves de bronquiolite por ano. A infecção promove o influxo de células imunes populando o tecido predominantemente com neutrófilos. Estimulado pelo epitélio infectado e por proteínas virais, os neutrófilos secretam seu material genético imiscuído com enzimas granulares que formam as armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs). Essas estruturas possuem ampla atividade microbicida, porém apresentam grande potencial citotóxico, sendo comumente associadas a grande parte do dano tecidual, com consequente agravamento do quadro clínico. Pacientes infectados com hRSV apresentam grande quantidade de neutrófilos e elevado nível de enzimas neutrofílicas nas secreções do trato respiratório, entretanto pouco se sabe sobre a capacidade anti-hRSV dessas proteínas. Intuindo contribuir na elucidação do papel das NETs na infecção por hRSV, propôs-se avaliar o efeito de algumas enzimas sobre a replicação do hRSV *in vitro*. Para tanto, o efeito da replicação do hRSV, isoladamente ou na presença de diversas concentrações de enzimas das NETs (Mieloperoxidase, Proteínase 3, Catepsina G e Elastase) foi caracterizado e quantificado através de análises morfológicas, ensaios de viabilidade utilizando células HEp-2, perfil eletroforético e ensaios de redução de placas de lise. A presença de Proteínase 3, Catepsina G e Elastase reduziu a morte celular e a formação de placas de lise induzidas pela infecção, bem como a formação de sincícios, uma característica da replicação *in vitro*. O perfil eletroforético sugere que a proteína F viral, envolvida nos processos de adesão e fusão, interage com estas enzimas gerando pesados complexos ou mesmo clivagem da proteína viral. O conjunto dos resultados, associado ao descrito na literatura, indica que as enzimas das NETs possuem relevante efeito anti-hRSV, provavelmente via interação com as proteínas de superfície do vírion, como a proteína de fusão F.

Palavras-chave: hRSV. Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas. Antiviral.

Abstract

Respiratory infections are extremely common, and the Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the main etiologic agent of acute viral infections of the lower respiratory tract, resulting in more than 3 million very serious cases of bronchiolitis worldwide each year. The infection promotes the influx of immune cells populating the tissue predominantly with neutrophils. Stimulated by the infected epithelium and viral proteins, neutrophils secrete their genetic material intermingled with granular enzymes that form the neutrophil extracellular traps (NETs). These structures have huge microbicidal activity, but have cytotoxic potential, being commonly associated with a large part of tissue damage, with consequent worsening of the clinical condition. Patients infected with hRSV have a large amount of neutrophils and a high level of neutrophilic enzymes in respiratory tract secretions, however little is known about the anti-hRSV capacity of these proteins. Intending to contribute to the elucidation of the role of NETs in hRSV infection, it was proposed to evaluate the effect of some enzymes of NETs upon hRSV replication *in vitro*. Therefore, the effect of hRSV replication, alone or in the presence of different concentrations of NETs enzymes (Myeloperoxidase, Proteinase 3, Cathepsin G and Elastase) was characterized and quantified through morphological analyzes, cell viability tests, electrophoretic profile and reduction of lysis plates. The presence of Proteinase 3, Cathepsin G and Elastase reduced cell death and the formation of lysis plaques induced by infection, as well as the formation of syncytia, a characteristic of *in vitro* replication. The electrophoretic profile suggests that the viral F protein, involved in the adhesion and fusion processes, interacts with those enzymes generating heavy complexes or even cleavage of the viral protein. Our results, in association with literature, indicates that NETs enzymes have a relevant anti-hRSV effect, probably via interaction with virion surface proteins, such as the fusion protein F.

Keywords: hRSV. Neutrophil extracellular traps . Antiviral.

Lista de ilustrações

- Figura 1 – Esquema da distribuição dos genes do hRSV. O hRSV possui 10 genes, destacado em tons de verde as proteínas transmembrana que medeiam as etapas iniciais do processo de adesão e internalização. Fonte: o autor. 32
- Figura 2 – Detalhe da estrutura da proteína F. A proteína F é traduzida como precursor F0, o peptídeo de sinal (SP) é clivado ainda no transporte intracelular. A proteína passa ainda por mais duas clivagens que culminam na liberação de um pequeno peptídeo solúvel (pep27), induzindo a transição da conformação pré-fusão (PDB: 4JHW) para a pós-fusão (PDB: 3RRT) que levam a aproximação e fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro. Fonte: o autor. 34
- Figura 3 – Esquema de distribuição das proteínas estruturais do hRSV. As proteínas transmembrana (também denominadas proteínas de superfície) F, G e SH medeiam as etapas iniciais da infecção (adesão e internalização). Fonte: o autor. 36
- Figura 4 – Aspecto das Armadilhas Extracelulares Neutrófilicas (NETs). Sob certos estímulos, neutrófilos iniciam o mecanismo de liberação das NETs, formando estruturas capazes de capturar e/ou inativar microorganismos. Fonte: adaptado de Brinkmann et al.^[1] e Brinkmann e Zychlinsky^[2]. 40
- Figura 5 – Principais tipos de liberação das NETs. Sob determinados estímulos, alguns neutrófilos desencadeiam alterações intra e extracelulares, liberando parte do seu material genético imiscuído em conteúdo granular. Fonte: adaptado de Burgener e Schroder^[3]. 41

- Figura 6 – Desenho experimental. Os ensaios com as proteínas provenientes das NETs foram realizadas em três etapas: efeito dessas proteínas sob a morfologia e viabilidade de células HEp-2 (destacado em azul); efeito dessas proteínas sob a replicação *in vitro* do hRSV (destacado em vermelho); e se as proteínas presentes nas NETs interagem diretamente com a proteína viral de fusão (destacado em verde). MTT, ensaio de viabilidade celular inferido pela metabolização tetrázolio; CC50, concentração em que a viabilidade celular é reduzida em 50%; PFU, do inglês *plaque forming units* (unidades formadoras de placas). Fonte: o autor. 49
- Figura 7 – Redução do sal de tetrazólio em formazana. O sal de MTT penetra nas células onde é convertido em formazana por enzimas associadas à membrana das mitocôndrias. A viabilidade pode ser inferida como sendo diretamente proporcional a formação de formazada, quanto maior a intensidade da coloração roxo escura, maior a viabilidade das células. O dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) e oxidado (NAD⁺). Fonte: o autor. 59
- Figura 8 – Detalhes da Ribavirina. A Ribavirina possui estrutura semelhante a dos nucleosídeos, existem diversas versões comerciais, sendo as mais comuns as de uso oral. Possui comprovada atividade contra diversos vírus de DNA e RNA. Fonte: o autor. 61
- Figura 9 – Determinação da CC50 para a Ribavirina. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Ribavirina (8–64000 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas, o metabolismo celular foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias foram normalizados pela média do controle celular. O retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 4. Fonte: o autor. 62

- Figura 10 – Estrutura do Palivizumabe. O Palivizumabe corresponde a porção Fab de um anticorpo IgG humanizado do tipo 1. Sua estrutura tridimensional complexada com a proteína de fusão foi determinada por Difração de Raios-X (PDB: 5J3D). Embora seja a única droga aprovada para o tratamento profilático, sua produção é restrita a poucos laboratórios e seu custo considerado elevado. Fonte: o autor. 63
- Figura 11 – Determinação da CC50 do Palivizumabe. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Palivizumabe (0,06–675 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 5. Fonte: o autor. 64
- Figura 12 – Estrutura da Mieloperoxidase. Aspecto geral do homodímero Mieloperoxidase (PDB: 1CXP). Os monômeros estão marcados em azul e vermelho, o sítio ativo está destacado em amarelo e por último, detalhes da estrutura da Fe-protoporfirina IX. Fonte: o autor. 65
- Figura 13 – Determinação da CC50 da Mieloperoxidase. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Mieloperoxidase (0,5–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 6. Fonte: o autor. 66
- Figura 14 – Estrutura da Proteinase 3. Aspecto da superfície molecular da Proteinase 3 (PDB: 1FUJ). As pontes dissulfeto estão destacadas em rosa e o resíduos que compõem a tríade do sítio ativo em amarelo. Fonte: o autor. 67

- Figura 15 – Determinação da CC50 da Proteinase 3. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Proteinase 3 (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 7. Fonte: o autor. 68
- Figura 16 – Estrutura da Catepsina G. Aspecto da superfície molecular da Catepsina G (PDB: 1AU8). As pontes dissulfeto estão destacadas em rosa e o resíduos que compõem a tríade do sítio ativo em amarelo. Fonte: o autor. 69
- Figura 17 – Determinação da CC50 da Catepsina G. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Catepsina G (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 8. Fonte: o autor. 70
- Figura 18 – Estrutura da Elastase. Aspecto da superfície molecular da Elastase (PDB: 3Q76). As pontes dissulfeto estão destacadas em rosa e o resíduos que compõem a tríade do sítio ativo em amarelo. Fonte: o autor. 71

- Figura 19 – Determinação da CC50 da Elastase. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Elastase (0,1–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 9. Fonte: o autor. 72
- Figura 20 – Determinação da TCID50 do estoque viral. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas por 2 horas com várias concentrações do estoque viral com volume final de 20 μL /poço (exceto o grupo de 32 μL), o sobrenadante foi substituído por meio de cultivo e as células incubadas por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os dados do gráfico constam na Tabela 3. Fonte: o autor. 74
- Figura 21 – Aspecto da monocamada de HEp-2 infectada por hRSV. A fusão de células adjacentes é uma das principais características da infecção por hRSV. Monocamadas confluentes de HEp-2 não infectadas, células justapostas e com tamanho semelhante (hRSV -, A e B). Monocamadas infectadas, as setas indicam a presença de sincícios (hRSV +, A–C). Fonte: adaptado de Huong et al.^[4], Bitko et al.^[5] e Tian et al.^[6]. . . . 75
- Figura 22 – Aspecto da monocamada de HEp-2 infectadas com hRSV. Células HEp-2 foram infectadas com diferentes concentrações de estoque viral por 2 horas e incubadas por 72 horas. Imagens destacadas em azul correspondem ao grupo controle celular. Microscopia de campo claro, objetiva de 4X. Fonte: o autor. 76

- Figura 23 – Detalhe de Sincícios em Células HEp-2. Registro das alterações na estrutura da monocamada (formação de sincícios) induzidas pela propagação hRSV durante a determinação da TCID50 (setas). Microscopia de campo claro, objetiva de 10X. Fonte: o autor. 76
- Figura 24 – Esquema de construção das panorâmicas. Dezenas de fotos com sobreposição mínima de 40% foram registradas percorrendo o diâmetro do poço. As imagens foram padronizadas (correção e dessaturação) e a detecção dos pontos de colagem foi feita pelo algoritmo AutoStitch. A imagem final mostra o aspecto da monocamada ao longo do diâmetro do poço, cobrindo cerca de 30% da área total. Fonte: o autor. 78
- Figura 25 – Aspecto da monocamada no ensaio de CC50. Células HEp-2 foram incubadas por 2 horas com diferentes concentrações de Proteinase 3 (azul), Catepsina G (verde) e Elastase (vermelho). Após 72 horas, o aspecto foi registrado utilizando a técnica de imagem panorâmica. Fonte: o autor. 80
- Figura 26 – Aspecto da monocamada Mieloperoxidase. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. A pré-incubação do hRSV com Mieloperoxidase por 2 horas não foi capaz de reduzir visualmente a formação de sincícios em nenhuma das concentrações testadas. Fonte: o autor. 82
- Figura 27 – Aspecto da monocamada Proteinase 3. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. O aspecto da monocamada foi registrado como o descrito na Figura 24. A pré-incubação do hRSV com Proteinase 3 por 2 horas reduziu visualmente a formação de sincícios nas maiores concentrações testadas. Fonte: o autor. 84

Figura 28 – Aspecto da monocamada Catepsina G. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. O aspecto da monocamada foi registrado como o descrito na Figura 24. A pré-incubação do hRSV com Catepsina G por 2 horas reduziu drasticamente a formação de sincícios nas concentrações de 2–4 $\mu\text{mol/mL}$. Fonte: o autor.	86
Figura 29 – Aspecto da monocamada Elastase. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. A pré-incubação do hRSV com Elastase por 2 horas reduziu drasticamente a formação de sincícios em várias concentrações testadas. Fonte: o autor.	88
Figura 30 – Processo de determinação do <i>Thresholding</i> . O controle viral foi utilizado para calibrar, via inspeção visual da sobreposição, o nível de <i>Thresholding</i> que melhor representasse os sincícios da monocamada. O <i>Thresholding</i> foi realizado com auxílio do IMAGEJ e a sobreposição da quantificação com a panorâmica original foi realizada no GIMP. Fonte: o autor.	90
Figura 31 – Processo detalhado da quantificação dos sincícios. Etapas empregadas na conversão das imagens panorâmicas (dados qualitativos) em tabelas com o número e tamanho dos sincícios (dados quantitativos). Os ajustes de contraste e <i>Thresholding</i> foram realizados manualmente com auxílio dos softwares GIMP e IMAGEJ. Fonte: o autor.	92
Figura 32 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito na seção 6.3.2, os dados constam na Tabela 16. Fonte: o autor.	94

Figura 33 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Proteinase 3. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito em 6.3.2, os dados dos gráficos constam na Tabela 17. Fonte: o autor.	96
Figura 34 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Catepsina G. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito na seção 6.3.2, os dados do gráfico constam na Tabela 18. Fonte: o autor.	98
Figura 35 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Elastase. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito na seção 6.3.2, os dados do gráfico constam na Tabela 19. Fonte: o autor.	100
Figura 36 – Detalhes do gráfico de Proteção Celular. Após o protocolo de de Proteção Celular (seção 5.7.2) as absorbâncias foram convertidas em índice de Proteção Celular (Equação 5.2), a média aritmética dos controles \pm o desvio padrão foram convertidos em faixas (Azul para CC e cinza para CV). Fonte: o autor.	102
Figura 37 – Principais mecanismos de ação da Ribavirina. A substituição da Guanosina pela Ribavirina aumenta expressivamente a taxa de mutação do mRNA, alterando a estrutura das proteínas virais, concomitantemente, devido a alta afinidade com a Inosina Monofosfato Desidrogenase, a presença de Ribavirina no citosol reduz a produção de guanosina. Fonte: o autor.	103

- Figura 38 – Proteção Celular da Ribavirina. Monocamadas de HEp-2 foram inoculadas com hRSV e em seguida pós-tratadas com diversas concentrações de Ribavirina (8–640 $\mu\text{mol/mL}$). A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 10. Fonte: o autor. 104
- Figura 39 – Interação entre o Palivizumabe e a Proteína de Fusão do hRSV. O trímero que compõem a proteína de fusão do hRSV apresenta 2 estados conformacionais predominantes, pré e pós-fusão. O Palivizumabe pode se ligar em ambas conformações, pois foi desenvolvido para interagir com um epítipo conservado entre as conformações, o sítio antigênico II (destacado em azul). Fonte: o autor. 105
- Figura 40 – Proteção Celular do Palivizumabe. O hRSV foi pré-incubado em concentrações de Palivizumabe por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas conforme a Equação 5.2. Os dados constam na Tabela 11. Fonte: o autor. 106
- Figura 41 – Proteção Celular da Mieloperoxidase. O hRSV foi pré-incubado em Mieloperoxidase (0,2–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção. Os dados do gráfico constam na Tabela 12. Fonte: o autor. 108
- Figura 42 – Proteção Celular da Proteinase 3. O hRSV foi pré-incubado em diferentes concentrações de Proteinase 3 (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas no índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 13. Fonte: o autor. 110

- Figura 43 – Proteção Celular da Catepsina G. O hRSV foi pré-incubado em diferentes concentrações de Catepsina G (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas no índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 14. Fonte: o autor. 112
- Figura 44 – Proteção Celular da Elastase. O hRSV foi pré-incubado em diferentes concentrações de Elastase (0,2–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas no índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 15. Fonte: o autor. 114
- Figura 45 – Perfil eletroforético da proteína r hRSV F fornecido pelo fabricante. M indica a faixa do marcador de peso molecular, R a faixa onde a proteína foi incubada em condição redutora e NR a faixa em condição não redutora. Fonte: Sino Biological. 115
- Figura 46 – Esquema gel de poliacrilamida. Após o protocolo de coloração com nitrato de prata as faixas foram selecionadas (1, Marcador; 2, hRSV-F e os demais números para as proteínas teste), os picos foram identificados com auxílio dos gráficos densitométricos calculados pela função “Plot Lanes” do software IMAGEJ. Fonte: o autor. 116
- Figura 47 – Gel de poliacrilamida da Mieloperoxidase. A Mieloperoxidase foi pré-incubada por 2 horas com a r hRSV F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio, os picos das faixas foram identificados com auxílio da ferramenta “Gels” do software IMAGEJ. Fonte: o autor. . . . 118

- Figura 48 – Gel de poliacrilamida da Proteinase 3. A Proteinase 3 foi pré-incubada por 2 horas com a hRSV-F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio, as faixas foram quantificadas com auxílio da ferramenta “Gels” do software IMAGEJ. Fonte: o autor. 120
- Figura 49 – Gel de poliacrilamida da Catepsina G. A Catepsina G foi pré-incubada por 2 horas com a hRSV-F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio, o perfil densitométrico das faixas foi realizado com auxílio da ferramenta “Gels” do software IMAGEJ. Fonte: o autor. . . . 122
- Figura 50 – Gel de poliacrilamida da Elastase. A Elastase foi pré-incubada por 2 horas com a hRSV-F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. Fonte: o autor. 124
- Figura 51 – Aspecto das placas de lise do hRSV. Fonte: adaptado de McKimm-Breschkin^[7] Yang, Li e Huang^[8] e Numataa et al.^[9]. 125
- Figura 52 – Esquema de construção das imagens do ensaio de placa. As monocamadas de HEp-2 foram registradas via câmera digital acoplada em lupa, as fotos foram agrupadas de modo a formarem uma imagem única e contabilizadas com auxílio da ferramenta “Multi-point” do IMAGEJ. Fonte: o autor. 126
- Figura 53 – Ensaio de redução de placa da Proteinase 3. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Proteinase 3 por duas horas. Após 5 dias as monocamadas foram formalizadas (formaldeído 3%) e coradas com solução de corante vermelho neutro (0,05%). Os dados do gráfico constam na Tabela 20. Fonte: o autor. 128

Figura 54 – Ensaio de redução de placa da Catepsina G. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Catepsina G por duas horas. Após 5 dias as monocamadas foram formalizadas (formaldeído 3%) e coradas com solução de corante vermelho neutro (0,05%). Os dados do gráfico constam na Tabela 21. Fonte: o autor.	130
Figura 55 – Ensaio de redução de placa da Elastase. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Elastase por duas horas. Após 5 dias as monocamadas foram formalizadas (formaldeído 3%) e coradas com solução de corante vermelho neutro (0,05%). Os dados do gráfico constam na Tabela 22. Fonte: o autor.	132
Figura 56 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 44 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Mieloperoxidase (0,1-32 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.	156
Figura 57 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 90 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Proteinase 3 (0,1-16 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.	157
Figura 58 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 90 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Catepsina G (0,1-16 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.	158
Figura 59 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 40 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Elastase (0,1-32 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.	159
Figura 60 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 68 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Elastase (0,1-32 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.	160
Figura 61 – Ensaio de redução de placas da Proteinase 3. Os dados dos gráficos constam na Tabela 20. Fonte: o autor.	161
Figura 62 – Ensaio de redução de placa da Catepsina G. Os dados dos gráficos constam na Tabela 21. Fonte: o autor.	162
Figura 63 – Ensaio de redução de placa da Elastase. Os dados dos gráficos constam na Tabela 22. Fonte: o autor.	163

Figura 64 – Primeira página do artigo publicado em 2018 na <i>Virus Research</i> . Fonte: o autor.	164
Figura 65 – Primeira página do artigo publicado em 2020 na <i>Virus Research</i> . Fonte: o autor.	165
Figura 66 – Primeira página do artigo publicado em 2020 na <i>Brazilian Journal of Biology</i> . Fonte: o autor.	166
Figura 67 – Primeira página do artigo publicado em 2020 na <i>BMC Chemistry</i> . Fonte: o autor.	167

Lista de tabelas

Tabela 1	– Proteínas encontradas nas NETs. A composição das NETs pode variar de acordo com o estímulo indutor e, embora seja composta predominantemente de DNA, diversos componentes celulares associados participam ativamente do processo e são liberados durante o mecanismo de liberação das NETs. Fonte: modificado de Petretto et al. ^[10]	43
Tabela 2	– Resumo dos resultados dos ensaios realizados com as enzimas das NETs. Destacado em amarelo as condições consideradas nesse trabalho como relevantes para caracterizar a ação direta destas enzimas sobre o vírion do hRSV. Fonte: o autor.	134
Tabela 3	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de TCID50 (Figura 20). Fonte: o autor.	184
Tabela 4	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Ribavirina (Figura 9). Fonte: o autor.	184
Tabela 5	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 do Palivazumabe (Figura 11). Fonte: o autor.	185
Tabela 6	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Mieloperoxidase (Figura 13). Fonte: o autor.	185
Tabela 7	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Proteinase 3 (Figura 15). Fonte: o autor.	186
Tabela 8	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Catepsina G (Figura 17). Fonte: o autor.	186
Tabela 9	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Elastase (Figura 19). Fonte: o autor.	187
Tabela 10	– Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Ribavirina (Figura 38). Fonte: o autor.	187

Tabela 11 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular do Palivizumabe (Figura 40). Fonte: o autor.	188
Tabela 12 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Mieloperoxidase (Figura 41). Fonte: o autor.	188
Tabela 13 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Proteinase 3 (Figura 42). Fonte: o autor.	189
Tabela 14 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Catepsina G (Figura 43). Fonte: o autor.	190
Tabela 15 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Elastase (Figura 44). Fonte: o autor.	191
Tabela 16 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Mieloperoxidase (Figura 32). Fonte: o autor.	192
Tabela 17 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Proteinase 3 (Figura 35). Fonte: o autor.	192
Tabela 18 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Catepsina G (Figura 34). Fonte: o autor.	192
Tabela 19 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Elastase (Figura 35). Fonte: o autor.	193
Tabela 20 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Redução de Placas da Proteinase 3 (Figura 53 e Apêndice F). Fonte: o autor.	193
Tabela 21 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Redução de Placas da da Catepsina G (Figura 54 e Apêndice G). Fonte: o autor.	194
Tabela 22 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Redução de Placas da da Elastase (Figura 55 e Apêndice H). Fonte: o autor.	194

Lista de abreviaturas e siglas

abnTEX	Absurdas Normas para TeX
C5a	<i>Complement Component 5a</i>
CC	Controle Celular
CC50	Concentração Citotóxica 50%
CCA	<i>Chimpanzee Coryza Agent</i>
CE50	Concentração Efetiva 50%
CP50	Concentração de Proteção 50%
CV	Controle Viral
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	<i>Deoxyribonuclease</i>
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEp-2	<i>Human Epithelial type 2</i>
hRSV	<i>Human Respiratory Syncytial Virus</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
MPr	<i>Máxima Proteção registrada</i>

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTT	<i>2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole;bromide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NOX	<i>Family of NADPH oxidases</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
Pars	<i>Protease-Activated Receptor</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
r hRSV F	<i>Recombinant Human Respiratory Syncytial Virus Fusion protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
TCID50	<i>Tissue Culture Infective Dose 50%</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
XTT	<i>2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide</i>
α_1 -PI	<i>Alpha-1-proteinase inhibitor</i>

Lista de símbolos

nm	Nanômetro
kDa	<i>kiloDaltons</i>
kb	<i>kilobase pair</i>
pI	Ponto Isoelétrico
MP	Megapixel
ng	Nanograma

Sumário

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	Epidemiologia	30
1.2	O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)	31
1.2.1	Histórico	31
1.2.2	Taxonomia e nomenclatura	31
1.2.3	Genoma e estrutura	32
1.2.4	Ciclo replicativo	36
1.2.5	Patologia	37
1.3	Neutrófilos e a infecção por hRSV	38
1.3.1	Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas (NETs)	39
1.3.2	Enzimas Granulares	42
1.4	Tratamento das Infecções Causadas por hRSV	44
2	HIPÓTESE	47
3	OBJETIVOS	48
4	DESENHO EXPERIMENTAL	49
5	MÉTODOS	50
5.1	Células HEp-2	50
5.1.1	Cultura	50
5.1.2	Ensaio de Viabilidade	50
5.2	Vírus Sincicial Respiratório Humano	51
5.2.1	Estoque	51
5.2.2	Titulação	51
5.3	Ribavirina	51
5.4	Palivizumabe	52
5.5	Proteínas Isoladas	52
5.5.1	Proteína de Fusão Recombinante (r hRSV F)	52
5.5.2	Proteínas Neutrofílicas	52

5.6	Determinação da Citotoxicidade	52
5.7	Atividade Anti-hRSV	53
5.7.1	Formação de Sincícios (Imagens)	53
5.7.1.1	Construção das Panorâmicas	53
5.7.1.2	Quantificação dos Sincícios	54
5.7.2	Proteção Celular	54
5.7.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	55
5.7.4	Ensaio de Redução de Placa	55
5.8	Softwares	56
5.8.1	Elaboração do Texto	56
5.8.2	Manipulação das Imagens	56
5.8.3	Análises Estatísticas	57
5.8.4	Tabelas e Gráficos	57
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1	Determinação da Citotoxicidade	58
6.1.1	CC50: Ribavirina	61
6.1.2	CC50: Palivizumabe	63
6.1.3	CC50: Mieloperoxidase	65
6.1.4	CC50: Proteinase 3	67
6.1.5	CC50: Catepsina G	69
6.1.6	CC50: Elastase	71
6.2	Titulação do Estoque Viral	73
6.3	Atividade Anti-hRSV	77
6.3.1	Alterações Morfológicas	77
6.3.1.1	Alterações induzidas pelas enzimas das NETs (CC50)	79
6.3.1.2	Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase	81
6.3.1.3	Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Proteinase 3	83
6.3.1.4	Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Catepsina G	85
6.3.1.5	Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Elastase	87
6.3.2	Quantificação Sincicial	89
6.3.2.1	Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase	93
6.3.2.2	Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Proteinase 3	95
6.3.2.3	Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Catepsina G	97

6.3.2.4	Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Elastase	99
6.3.3	Proteção Celular	101
6.3.3.1	Proteção Celular: Ribavirina	103
6.3.3.2	Proteção Celular: Palivizumabe	105
6.3.3.3	Proteção Celular: Mieloperoxidase	107
6.3.3.4	Proteção Celular: Proteinase 3	109
6.3.3.5	Proteção Celular: Catepsina G	111
6.3.3.6	Proteção Celular: Elastase	113
6.3.4	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	115
6.3.4.1	Eletroforese Mieloperoxidase	117
6.3.4.2	Eletroforese Proteinase 3	119
6.3.4.3	Eletroforese Catepsina G	121
6.3.4.4	Eletroforese Elastase	123
6.3.5	Ensaio de Redução de Placas	125
6.3.5.1	Redução de Placas: Proteinase 3	127
6.3.5.2	Redução de Placas: Catepsina G	129
6.3.5.3	Redução de Placas: Elastase	131
7	RESUMO DOS RESULTADOS	133
8	CONCLUSÃO	135
	REFERÊNCIAS	136
	APÊNDICES	155
	APÊNDICE A – MORFOLOGIA MPO , 44H	156
	APÊNDICE B – MORFOLOGIA PRTN 3, 90 H	157
	APÊNDICE C – MORFOLOGIA CTSG , 90H	158
	APÊNDICE D – MORFOLOGIA ELANE , 40H	159
	APÊNDICE E – MORFOLOGIA ELANE , 68H	160

APÊNDICE F – PLACA DE LISE PROTEINASE 3, 120 HORAS	161
APÊNDICE G – PLACA DE LISE CATEPSINA G, 120 HORAS	162
APÊNDICE H – PLACA DE LISE ELASTASE, 120 HORAS	163
APÊNDICE I – ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODO, 1	164
APÊNDICE J – ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODO, 2.	165
APÊNDICE K – ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODO, 3.	166
APÊNDICE L – ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODO, 4	167
APÊNDICE M – ARTIGO REFERENTE À TESE APRESENTADA.	168
APÊNDICE N – DADOS E ESTATÍSTICA	183

1 Introdução

1.1 Epidemiologia

As infecções do trato respiratório de etiologia viral são extremamente comuns. Ao respirar, internalizamos um grande volume de ar, expondo as células epiteliais do trato respiratório a partículas em suspensão que podem carregar agentes patogênicos (fômites).

O hRSV é o principal agente etiológico de infecções agudas do trato respiratório inferior, estima-se que praticamente todas as crianças com até 2 anos de idade tenham sido infectadas pelo menos uma vez. O hRSV infecta também adultos de todas as idades, principalmente idosos e indivíduos imunocomprometidos. Na maioria dos casos, o indivíduo imunocompetente consegue resolver a infecção sem maiores complicações em menos de uma semana ^[11].

O hRSV geralmente infecta através do contato direto dos aerossóis expelidos durante a tosse ou expiro de um indivíduo contaminado, com as mucosas nasais, bucais e oculares de outras pessoas ^[11]. Crianças com até 2 anos de idade ou adultos com hábitos onicofágicos são especialmente susceptíveis ao contágio de diversas doenças, incluindo o hRSV, devido ao constante contato das mãos com a mucosa bucal ^[12].

Os dois subtipos de hRSV tem distribuição mundial e são altamente contagiosos, sendo comum encontrar um indivíduo concomitantemente infectado pelo subtipo A e B ^[13]. Vários estudos relacionam as formas mais graves de infecção respiratória aguda com o subtipo A ^[14,15]. As infecções por hRSV ocorrem o ano todo, entretanto, é nos meses de inverno que costumam ocorrer os surtos epidêmicos e o maior número de casos graves que requerem hospitalização ^[16].

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que todo ano ocorram mais de 64 milhões de novos casos de infecções por hRSV ao redor do mundo e cerca de 5% deles requerem hospitalização, resultando em mais de 150 mil mortes anuais ^[17].

1.2 O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)

1.2.1 Histórico

Em 1955, pesquisadores do *Walter Reed Army Research Institute* (Washington, US) relataram sintomas de infecção do trato respiratório superior (tosse, espirros e coriza) em dezenas de chimpanzés do instituto. O agente etiológico foi isolado e denominado *Chimpanzee Coryza Agent* (CCA). Alguns meses depois, trabalhadores do instituto que tiveram contato direto com os animais diagnosticados com CCA, apresentaram sintomatologia semelhante à descrita pelos chimpanzés infectados^[18].

“upper respiratory infection occurred in a laboratory worker who was working with CCA and who had had intimate contact with the experimentally infected chimpanzees”, (Morris et al., 1956).

No ano seguinte, pesquisadores isolaram um vírus a partir de crianças com pneumonia com as mesmas características citopatológicas do CCA^[19]. Embora tenha sido identificado somente nos anos 50, outros pesquisadores já haviam descrito sintomatologia e achados histológicos semelhantes aos apresentados por humanos e animais infectados com CCA em crianças e idosos desde os anos 30^[20].

1.2.2 Taxonomia e nomenclatura

O *Human orthopneumovirus*, também conhecido como Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) foi durante muitos anos considerado membro da família Paramyxoviridae, entretanto, sua classificação e nomenclatura sofreram várias alterações recentes.

A classificação vigente estabelecida pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* agrupa três espécies no Gênero Orthopneumovirus (Vírus Sincicial Respiratório Humano, Murino e Bovino), entretanto, outras três espécies são apontadas como possíveis integrantes desse gênero.

1.2.3 Genoma e estrutura

O hRSV é um vírus de RNA fita simples de sentido negativo e seu genoma possui cerca de 15,2 kb (*kilobase pair*) distribuídos em 10 genes que codificam 11 proteínas devido a fase de leitura aberta no gene M2. As proteínas virais podem ser classificadas em estruturais, quando constituem alguma parte da partícula viral infectante (vírion), ou não estruturais, quando não compõem a estrutura do vírion (Figura 1). O hRSV possui duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e 9 proteínas estruturais (N, P, M, SH, G, F, M2 e L)^[21].

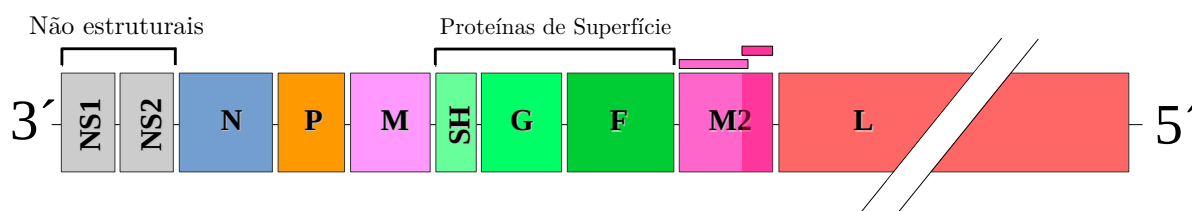


Figura 1 – Esquema da distribuição dos genes do hRSV. O hRSV possui 10 genes, destacado em tons de verde as proteínas transmembrana que medeiam as etapas iniciais do processo de adesão e internalização. Fonte: o autor.

Os genes mais próximos da região promotora e, portanto, os primeiros a serem codificados, originam duas pequenas proteínas não estruturais denominadas NS1 e NS2, que, nos diversos estágios da replicação, auxiliam na transcrição do restante do genoma, além de inibirem a sinalização de interferons do tipo 1 (IFN1) e de apoptose^[22].

A primeira proteína estrutural a ser transcrita (N) origina capsômeros que, quando agrupados ao redor do genoma, formarão o capsídeo. No hRSV a associação do capsídeo ao genoma forma um complexo de simetria helicoidal conhecido como nucleocapsídeo, que confere estabilidade e resistência as RNAses, além de atuar na regulação da transcrição do RNA viral^[22].

A fosfoproteína P (*Phosphoprotein*) atua como cofator na síntese de RNA, interage com as proteínas N e L mantendo-as na forma solúvel, aumentando sua disponibilidade e favorecendo a formação de complexos como os nucleocapsídeos, além de auxiliar o encapsulamento do RNA viral^[23].

O envelope viral é constituído majoritariamente pela proteína M (*Ma-*

trix), que, nos estágios iniciais da infecção, pode atuar inibindo a transcrição das moléculas da célula hospedeira, priorizando a transcrição das moléculas virais^[24]. A proteína M desempenha papel crucial no brotamento da partícula viral, interagindo com a actina e atuando no complexo ribonucleoprotéico (RNP), facilitando a montagem e inibindo atividade transcricional do nucleocapsídeo antes da encapsulação^[25].

A menor proteína estrutural SH (*Small Hydrofobic*) ainda não tem função claramente definida. Alguns trabalhos indicam que a proteína SH atua em conjunto com a proteína G melhorando a atividade da proteína F^[26]. Outros estudos suscitam que a proteína SH possa inibir a apoptose em diferentes linhagens celulares de mamíferos pelo bloqueio do TNF- α mediado pela sinalização apoptótica, ou, ainda, que a proteína SH altere a permeabilidade da membrana^[27].

Existe somente um sorotipo de hRSV subdividido em dois principais grupos antigênicos^[28]. Dentre as particularidades de cada subtipo, as variações na glicoproteína G são utilizadas atualmente na determinação de qual subtipo um isolado de hRSV pertence, geralmente através de ensaios de neutralização *in vitro* e pela reatividade a anticorpos monoclonais^[29]. A glicoproteína G (*Glycosylated*) provavelmente interage com um receptor heparina e/ou outro glicosaminoglicano, aderindo o vírion à membrana da célula hospedeira, estabilizando sua posição e dando início a etapa de internalização^[30]. Essa interação inicial não é essencial para que ocorra a infecção *in vitro*, entretanto, sem a ela a replicação é reduzida^[31].

A proteína transmembrana mais estudada é a proteína F (*Fusion*), responsável pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, liberando o nucleocapsídeo no citosol^[30]. A proteína F do hRSV apresenta estrutura semelhante à proteína de fusão de outros vírus respiratórios como o influenza, o que a torna um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e drogas antivirais de amplo espectro (Figura 2)^[32]. Além disso, trabalhos realizados com mutantes deficientes em proteína G e/ou SH demonstram que a proteína F isoladamente é capaz de realizar todas as etapas iniciais que culminam na fusão do vírion a célula hospedeira *in vitro*^[33–35].

Devido a uma fase de leitura aberta, o gene M2 codifica duas proteínas:

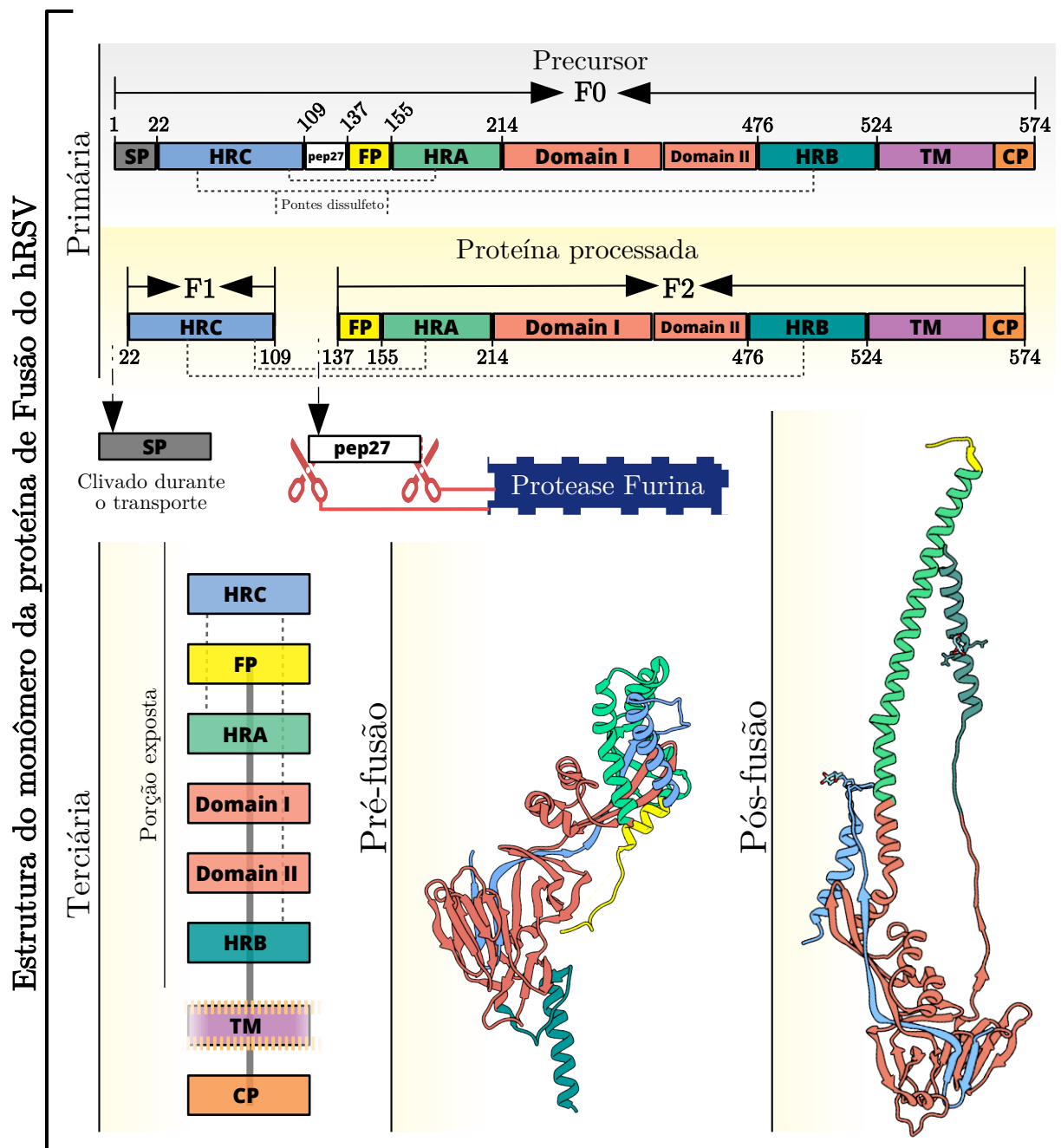


Figura 2 – Detalhe da estrutura da proteína F. A proteína F é traduzida como precursor F0, o peptídeo de sinal (SP) é clivado ainda no transporte intracelular. A proteína passa ainda por mais duas clivagens que culminam na liberação de um pequeno peptídeo solúvel (pep27), induzindo a transição da conformação pré-fusão (PDB: 4JHW) para a pós-fusão (PDB: 3RRT) que levam a aproximação e fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro. Fonte: o autor.

M2-1 e M2-2. A proteína M2-1 é essencial para a replicação viral, pois promove a transcrição do mRNA viral, prevenindo a parada precoce da transcrição por um mecanismo ainda em estudo^[36,37]. Acredita-se que a proteína M2-1 interaja com o mRNA em formação, estabilizando o complexo de transcrição (RNP) e/ou que a M2-1 melhore a atividade da polimerase, aumentando sua afinidade pelo RNA genômico^[38].

O balanço entre a transcrição e replicação é mediado pela proteína M2-2, que atua em conjunto com as proteínas não estruturais (NS1 e NS2), principalmente nos estágios finais da infecção, auxiliando na etapa de montagem do vírion^[39].

A maior proteína viral é denominada L (*Large*), com cerca de 250 kDa, apresenta seis regiões conservadas entre a família dos vírus de RNA com polaridade negativa de fita simples, o que a torna um alvo promissor para as pesquisas de compostos com atividade antiviral de amplo espectro^[40]. A proteína L é essencial para a replicação do hRSV, atua como uma RNA-polimerase-RNA-dependente (expansão do genoma), auxilia na formação da estrutura do *cap* e no processo de poliadenilação^[41,42].

O hRSV é um vírus envelopado (possui bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira) de RNA de fita simples e sentido negativo não segmentado. Os vírions são pleomórficos, entretanto, as formas mais comumente descritas são as esféricas e as cilíndricas (filamentosas). O tamanho do vírion pode variar de 120–350 nm, em culturas de células HEp-2, Tiwari et al.^[43] em um trabalho que registrou a morfologia dos vírions via microscopia atômica, os descrevem como protusões citoplasmáticas com diâmetro de 150–200 nm.

As proteínas transmembrana (SH, G e F) são ligadas ao envelope viral (M) e se estendem através da bicamada lipídica formando picos superficiais de 8–12 nm^[22]. No interior do envelope, as proteínas M2-1 e M2-2 ficam dispersas enquanto que as demais proteínas (N, P e L) associam-se ao RNA, formando o complexo RNP (Figura 3).

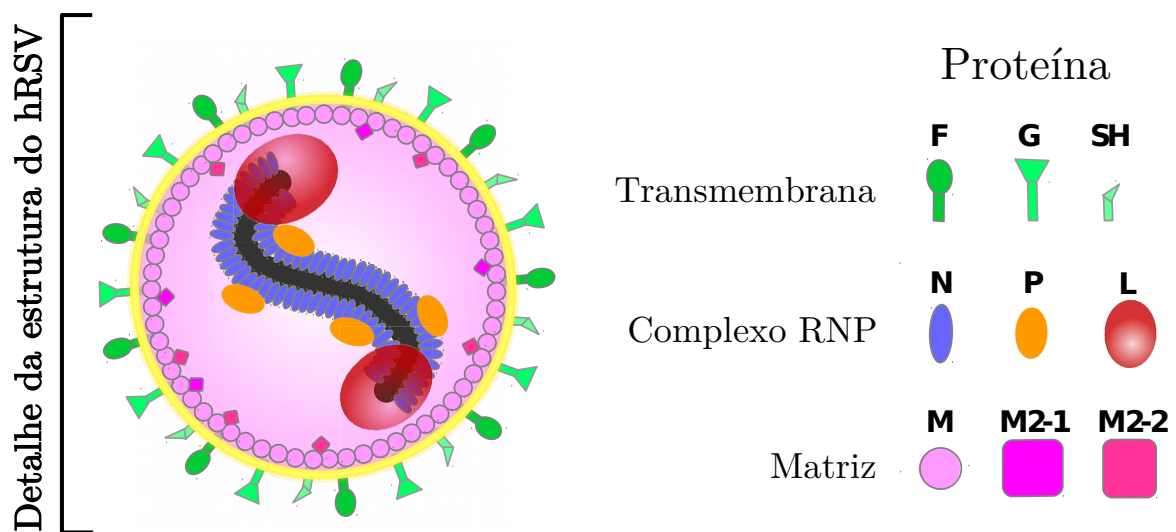


Figura 3 – Esquema de distribuição das proteínas estruturais do hRSV. As proteínas transmembrana (também denominadas proteínas de superfície) F, G e SH medeiam as etapas iniciais da infecção (adesão e internalização). Fonte: o autor.

1.2.4 Ciclo replicativo

Embora o mecanismo de infecção do hRSV não seja totalmente descrito, sabe-se que ele compreende basicamente as mesmas etapas do ciclo replicativo dos demais vírus respiratórios: adesão, internalização, proliferação e brotamento.

O vírus adsorve nas proteínas da membrana da célula hospedeira sendo o contato inicial mediado principalmente pela proteína G, que interage com receptores celulares, aproximando e estabilizando o vírion na superfície da membrana celular. Diversos trabalhos descrevem os prováveis receptores celulares envolvidos nessa fundamental etapa da replicação do hRSV e, até o momento sabe-se apenas quais são os prováveis candidatos. Um estudo recente descreveu uma co-localização entre vírions aderidos e a presença superficial da nucleolina na membrana celular, porém, isoladamente as proteínas não interagiram^[31,44,45].

Após a adesão a proteína F é clivada por uma protease celular, liberando um pequeno peptídeo solúvel (p27) e expondo o peptídeo de fusão. O peptídeo de fusão interage com as membranas celulares do hospedeiro, criando perturbações que culminam na fusão entre o envelope viral e a membrana celular, liberando o complexo RNP e as proteínas da matriz no citosol^[22].

Ao atravessar a membrana celular, as proteínas virais iniciam a transcrição do mRNA e do antigenoma. Os mRNA recém-transcritos são traduzidos em novas proteínas virais pelo maquinário celular e o antigenoma é transcrito novamente dando origem a uma cópia do genoma, ampliando o número de genomas disponíveis para a transcrição^[36].

O ciclo de transcrição/tradução permanecerá ativo durante todo o curso da infecção, amplificando o número de proteínas virais no citosol, formando os corpúsculos de inclusão. As proteínas M2-1, M2-2, NS1 e 2 regulam a atividade do complexo RNP estabelecendo um equilíbrio entre a produção de proteínas virais e da montagem e brotamento dos vírions^[46].

A montagem do envelope viral acontece em regiões específicas da superfície celular onde a proteína M interage com o complexo RNP e as proteínas SH, G e F, encapsulando o RNP e herdando uma bicamada lipídica da célula hospedeira durante o processo de brotamento^[47].

1.2.5 Patologia

O hRSV normalmente entra pelas mucosas do trato respiratório superior onde infecta via porção apical majoritariamente células do epitélio nasofaríngeo. O período de incubação estende-se por cerca de 5 dias (intensa replicação viral assintomática) e o pico de título viral geralmente é atingido logo após essa fase^[48].

As células epiteliais infetadas sofrem alteração da expressão de receptores de superfície envolvidos na ativação da resposta imune, aumentando a expressão de *Toll-like receptors* e Proteína Quinase R. No contexto de replicação viral, o lavado nasal de crianças com bronquiolite causada por hRSV apresenta níveis elevados de diversos mediadores pró-inflamatórias de citocinas e quimiocinas, como: IL 8, 10, 12, TNF- α e IFN- γ ^[49].

A presença viral favorece, ainda, a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM), aumentando a interação de leucócitos circulantes com o endotélio pulmonar e, conseqüentemente, contribuindo para o influxo e ativação leucocitária^[50].

No decorrer da infecção, algumas proteínas virais passam a ser expressas

na superfície das células infectadas, incluindo a proteína de fusão F e, consequentemente, a intensa replicação viral culmina na fusão de células epiteliais adjacentes, formando massas multinucleadas de citoplasma (sincícios), o que leva a disfunção e necrose tecidual^[51].

No trato respiratório superior, os principais sintomas relatados em crianças infectadas por hRSV são rinorreia, febre baixa, prostração, tosse e respiração ofegante. Em adultos infectados são relatados faringite, rinorreia, fadiga, tosse, cefaleia, mal-estar e febre^[52].

A maioria das infecções por hRSV se restringem ao trato respiratório superior, com duração média de até 8 dias. Os fatores envolvidos e a forma como a infecção transita do trato respiratório superior para o inferior ainda não são completamente descritos, porém, presume-se que partículas virais sejam aspiradas durante a respiração e/ou que a infecção se alastre pelo epitélio até os pulmões^[48].

No trato respiratório inferior, a replicação viral associada a co-infecções bacterianas induz intenso influxo leucocitário, causando pneumonia e/ou bronquiolite severa, o que bloqueia as vias aéreas pela produção excessiva de muco, edema e debris celulares. Nesse contexto a infecção pode durar meses, a respiração torna-se ofegante, difícil e dolorosa, agravando o quadro clínico do paciente, que pode vir a óbito por falência respiratória^[53].

1.3 Neutrófilos e a infecção por hRSV

Ao longo da infecção, os mediadores inflamatórios secretados pelas células epiteliais chegam à corrente sanguínea, onde são detectados pelas células efectoras do sistema imune, induzindo os processos de adesão e transmigração. Os neutrófilos são células da imunidade inata encontrados predominantemente na corrente sanguínea que reagem prontamente aos estímulos, migrando via quimiotaxia pelos tecidos até o sítio inflamatório^[54].

Durante a infecção por hRSV, os neutrófilos correspondem a cerca de 70% do infiltrado celular decorrente da resposta imune inata induzida pela replicação do hRSV^[52], atuando em conjunto com as barreiras físicas como linha de defesa

inicial, reconhecendo patógenos via *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) e secretando mediadores inflamatórios^[54].

Neutrófilos circulantes (inativos) são células de vida curta, durando cerca de 7 horas. Contudo, quando estimulado pela presença de patógenos e mediadores inflamatórios (ativos), podem durar até uma semana ou mais. Co-infecções bacterianas estão normalmente associadas a inflamação aguda crônica causada pelo hRSV e, nesse sentido, os neutrófilos exercem papel fundamental na defesa inata do epitélio respiratório^[55].

O mecanismo clássico de eliminação de microrganismos pelos neutrófilos é a fagocitose. Durante a fagocitose, prolongamentos citoplasmáticos envolvem o patógeno, internalizando-o e formando o fagossomo. No citosol, o fagossomo se funde aos grânulos neutrofílicos, expondo o patógeno a um arsenal de enzimas microbicidas e a altas taxas de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS)^[56].

Após a inativação e/ou degradação do patógeno, o neutrófilo geralmente entra em processo apoptótico, fragmentando seu DNA sem ruptura do envelope nuclear e formando vacúolos autofágicos. Os corpos apoptóticos, então, são removidos do tecido pelos macrófagos, prevenindo a exposição dessas estruturas citotóxicas ao sítio inflamatório^[56].

Esse ciclo (ativação, migração, fagocitose e apoptose) permanece ativo até a resolução e/ou normalização dos mediadores inflamatórios no tecido. Entretanto, a característica resposta do epitélio infectado, associada ao elevado influxo de neutrófilos observado nos casos mais graves de hRSV, induz a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, atuando como uma alça de retroalimentação positiva, que mantém o tecido inflamado^[57]. De fato, a presença deste tipo celular e seus produtos atingem níveis considerados elevados durante a bronquiolite aguda, podendo causar dano tecidual e agravamento do quadro clínico do paciente^[57].

1.3.1 Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas (NETs)

Os neutrófilos são células versáteis, com dezenas de mecanismos antimicrobianos descritos. Em determinadas condições e sob certos estímulos, os neutrófilos são capazes de projetar seu conteúdo intracelular, incluindo seu pró-

prio DNA, formando uma espécie de rede que captura e/ou inativa patógenos. Esse processo foi descrito em 2004 por Brinkmann et al., que registrou a formação das NETs (*Neutrophils Extracellular Traps*) e seu efeito bactericida (Figura 4)^[1].

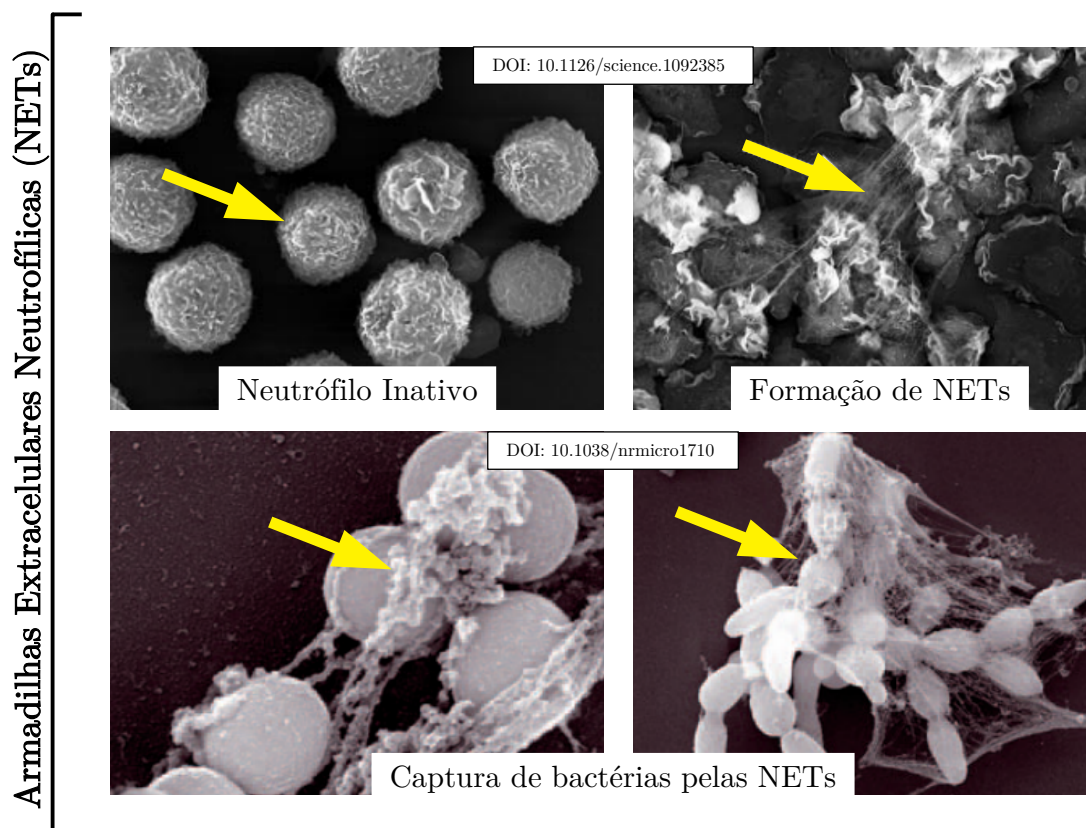


Figura 4 – Aspecto das Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas (NETs). Sob certos estímulos, neutrófilos iniciam o mecanismo de liberação das NETs, formando estruturas capazes de capturar e/ou inativar microorganismos. Fonte: adaptado de Brinkmann et al.^[1] e Brinkmann e Zychlinsky^[2].

A formação das NETs é um processo ativo e distinto da necrose e apoptose, que envolve o rearranjo da arquitetura nuclear (com descondensação da cromatina), citoplasmática e granular do neutrófilo^[2]. O processo de liberação das NETs não envolve a exposição extracelular de fosfatidilserina na membrana e nem fragmentação do DNA^[58].

A descrição e caracterização dos processos celulares que culminam na projeção do material genético avançou muito na última década, entretanto, esse ainda é um campo em ampla expansão, recheado de perguntas ainda sem res-

postas. Dentre os processos já descritos para a liberação das NETs, podemos destacar os dois principais: mecanismo suicida e mecanismo vital^[10].

O mecanismo suicida foi o primeiro a ser descrito e recebeu esse nome justamente porque o neutrófilo perde a viabilidade durante o processo que envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). É o mecanismo mais bem descrito, marcado pelo comprometimento das membranas mediado pela Gasdermina D (GSDMD), pela mistura dos componentes nucleares e citoplasmáticos, seguido de desintegração da membrana plasmática e liberação das NETs (Figura 5)^[59].

No mecanismo vital os neutrófilos permanecem viáveis, capazes de fagocitar patógenos, e sua vida útil não é reduzida pela perda de material genético^[60]. É um processo independente da ativação da GSDMD, portanto, não há comprometimento da membrana plasmática ou nuclear, o material genético a ser liberado pode ser oriundo do núcleo celular via liberação de vesículas “blebs”, ou de origem mitocondrial (Figura 5)^[3].

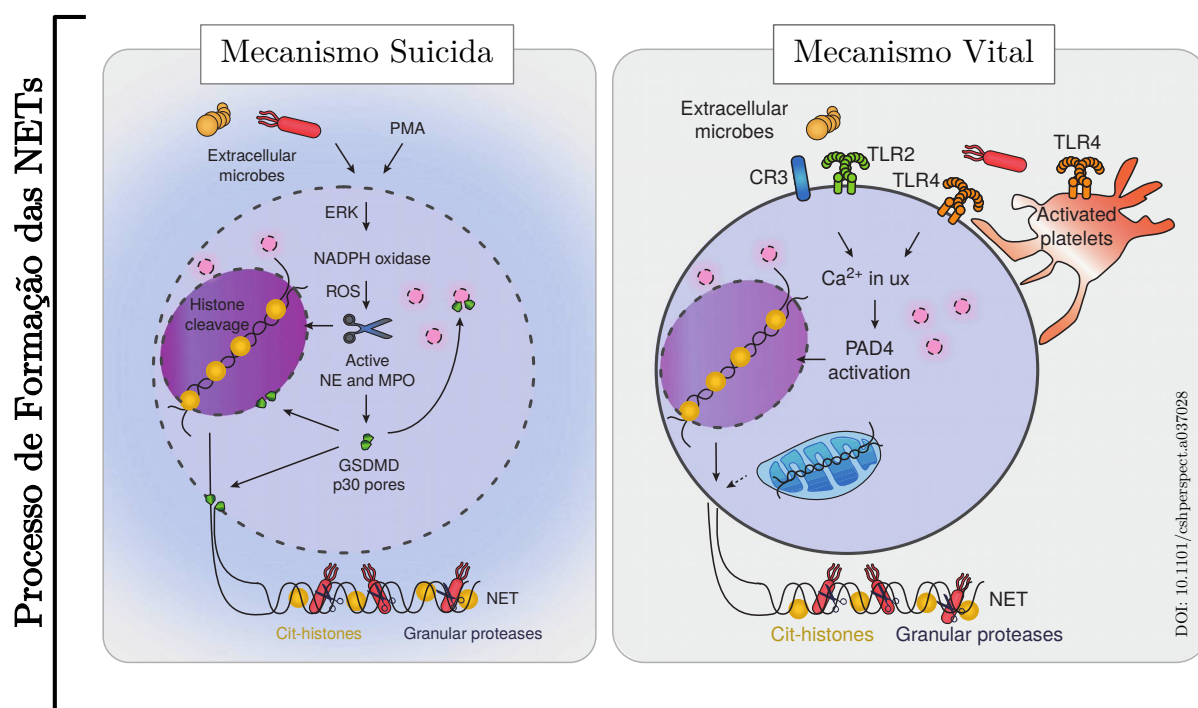


Figura 5 – Principais tipos de liberação das NETs. Sob determinados estímulos, alguns neutrófilos desencadeiam alterações intra e extracelulares, liberando parte do seu material genético imiscuído em conteúdo granular. Fonte: adaptado de Burgener e Schroder^[3].

As NETs podem ser produzidas frente a vários estímulos como: bactérias, fungos, protozoários entre outros^[1,61,62]. In vitro, diversos estímulos indutores de NETs foram descritos, sendo o Acetato de Forbol Miristato (PMA) e o Lipopolissacarídeo (LPS) os mais comumente empregados. Além disso, alguns trabalhos descrevem, ainda, a produção espontânea de NETs^[63-65].

As NETs são compostas basicamente por filamentos de cromatina descondensada e, associadas a essa estrutura básica, é possível encontrar praticamente todo o arsenal de enzimas contidas nos grânulos neutrofílicos. Essas enzimas atuam em várias etapas essenciais para que ocorra a formação e liberação das NETs.

1.3.2 Enzimas Granulares

Em condições de repouso, a maior parte das enzimas neutrofílicas ficam armazenadas dentro dos grânulos, porém, quando o neutrófilo é ativado, essas enzimas passam a desempenhar diversas atividades que vão muito além da sua capacidade microbicida, alterando a expressão de receptores celulares, ativando e inativando citocinas e quimiocinas, além de atuar nas vias de apoptose e nos mecanismos de liberação de NETs^[66].

Embora as NETs sejam predominantemente compostas por DNA, o perfil das proteínas imiscuídas a essa estrutura varia de acordo com o tipo de mecanismo de liberação de NETs e, conseqüentemente, do estímulo indutor^[10].

A Tabela 1.3.2 relaciona a presença (marcadas com o sinal "+") nas NETs de proteínas associadas à cromatina e de enzimas granulares, formadas frente a diferentes estímulos^[10].

Algumas enzimas granulares desempenham papel crucial para que haja a formação de NETs. Neutrófilos estimulados por PMA induzem a produção de Espécies Reativas de Oxigênio pelo complexo NADPH oxidase, ativando a proteína Mieloperoxidase e promovendo sua dissociação, juntamente com a dissociação da Elastase dos grânulos primários, em um processo parcialmente descrito^[67].

No citosol, a Elastase interage com um dos elementos essenciais do citoesqueleto, degradando a actina filamentosa e, conseqüentemente, imobilizando

Tabela 1 – Proteínas encontradas nas NETs. A composição das NETs pode variar de acordo com o estímulo indutor e, embora seja composta predominantemente de DNA, diversos componentes celulares associados participam ativamente do processo e são liberados durante o mecanismo de liberação das NETs. Fonte: modificado de Petretto et al.^[10].

Proteína	Gene	UniProt	Estímulo		
			PMA	LPS	Espontâneo
Histona H1	HIST1H1D	P16402			+
Histona H2A1J	HIST1H2AJ	Q99878	+	+	+
Histona H2A2B	HIST2H2AB	Q8IUE6	+		
Histona H3	H3F3B	K7EK07	+	+	+
Histona H4	HIST1H4A	P62805	+	+	+
Mieloperoxidase	MPO	P05164	+	+	+
Catepsina G	CTSG	P08311	+	+	+
Elastase	ELANE	P08246	+	+	
Proteinase 3	PRTN3	P24158	+	+	
Lisozima	LYZ	F8VV32	+	+	

o neutrófilo. No núcleo celular a proteína Mieloperoxidase e a Elastase atuam sinergicamente mediando a descondensação da cromatina via clivagem das histonas (H4 e H2B)^[68]. Além disso, diversas enzimas granulares como a Catepsina G, Proteinase 3 e Elastase interagem com a Gasdermina D, clivando-a em um processo fundamental para a formação dos poros de GSDMD^[59].

A presença recorrente das proteínas granulares nas NETs, secretadas via diferentes estímulos, evidencia o importante papel dessas enzimas no mecanismo de liberação das NETs (Tabela 1.3.2). A ausência de expressão de Elastase e/ou Mieloperoxidase reduzem drasticamente a formação de NETs no modelo murino^[68].

Apesar da imensa atividade bactericida, imunomodulatória e angiogênica, exercida pelas enzimas granulares, a produção excessiva de NETs em tecidos sensíveis é associada a diversas patologias graves, além de ser apontada como responsável pelo agravamento do quadro clínico de pacientes com inflamações crônicas^[69].

Lavados brônquicos de pacientes com infecção respiratória aguda contém

elevada quantidade de NETs. Nesse contexto, as fibras das NETs podem atuar como um espessante de muco, dificultando a expectoração e comprometendo a fisiologia pulmonar^[52]. Certamente a liberação excessiva ou acúmulo de NETs provoca dano tecidual devido a natureza de sua composição (DNA, histonas e proteases) e pela sua capacidade de induzir processos inflamatórios, causando doenças vasculares como trombose e aterosclerose^[54,70].

Diversos autores relatam a elevada quantidade de NETs nos pulmões como uma característica da infecção causada pelo hRSV. De fato, em 2015, Funchal et al. demonstraram que o contato de neutrófilos com partículas virais pode induzir a formação de NETs via mecanismo dependente de ROS^[71,72].

Durante a infecção por hRSV, neutrófilos são maciçamente recrutados para as vias respiratórias e produzem NETs em contato com o hRSV, promovendo inflamação, dano tecidual e comprometimento da função respiratória, como consequência do espessamento do muco. Apesar disso, o efeito das NETs sobre as partículas do hRSV ainda não foi esclarecido.

1.4 Tratamento das Infecções Causadas por hRSV

Desde sua descoberta nos anos 50, foram testados centenas de abordagens para combater as infecções do trato respiratório causadas pelo hRSV. Apesar disso, as atuais opções de tratamento são escassas e insuficientes e, na maior parte dos casos, medidas de alívio dos sintomas, suporte ventilatório e manutenção do estado geral são indicadas^[73].

Existem somente dois medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento das infecções por hRSV, o Palivizumabe e a Ribavirina.

As proteínas de superfície viral do hRSV tem sido alvo de diversos estudos que visam neutralizar a infecção viral pela inativação dessas proteínas^[74,75]. Mutantes sem as demais proteínas de superfície (G e SH) são capazes de replicar in vitro, o que indica que a proteína F é a única indispensável para que ocorra a infecção^[34]. Essa, dentre outras características, torna a proteína hRSV F um alvo ideal para o desenvolvimento de vacinas e drogas mais eficazes.

Nesse sentido, já foi demonstrado que o anticorpo monoclonal Palivizumabe é um neutralizante específico para a proteína F, oferecendo uma proteção passiva às crianças pertencentes aos grupos de risco, o que evita o aparecimento de doenças mais severas^[76,77]. O Palivizumabe interage em sítio conservado (presente conformações pré e pós-fusão) e inativa a proteína F, reduzindo a capacidade do vírion de fundir seu envelope com a membrana da célula hospedeira e, conseqüentemente, reduzindo a formação de sincícios e a replicação viral^[78]. Entretanto, a profilaxia com Palivizumabe é recomendada apenas a indivíduos pertencentes aos grupos considerados de risco, como os neonatos prematuros e as crianças com doenças cardíacas crônicas e/ou imunocomprometidos. Além disso, o custo do tratamento com o Palivizumabe é considerado elevado, restringindo ainda mais sua aplicabilidade^[76,79]

A Ribavirina é análogo nucleosídeo de guanina com atividade antiviral de amplo espectro contra hepatites A, B e C, influenza A e B, parainfluenza e herpes, que tem sido usado no tratamento de casos graves de infecções do trato respiratório inferior causadas por hRSV desde a década de 80. Entretanto, os mecanismos pelos quais a Ribavirina exerce sua atividade antiviral nunca foram completamente elucidados^[80]. Pode ser administrado por via oral, intra-venosa e na forma de aerosol, entretanto, a eficácia desse tratamento aparenta estar relacionada a um diagnóstico precoce da infecção por hRSV, o que geralmente não é possível devido à similaridade sintomática com outras infecções^[81].

Novos anticorpos monoclonais e diversas vacinas estão em desenvolvimento. Apesar disso, ao longo dos mais de 60 anos, dezenas de candidatos com promissora atividade anti-hRSV não apresentaram resultados satisfatórios em estudos clínicos de fase 2 e 3^[82]. Concomitantemente, novas estratégias tem sido propostas como forma alternativa de reduzir a infecção viral utilizando moléculas de baixo peso molecular, descrevendo diversos inibidores com promissora atividade anti-hRSV^[83,84].

Além disso, baseadas na elevada quantidade de NETs reportadas pela análise de lavados brônquicos de pacientes com casos graves de bronquiolite causada por hRSV, terapias focadas na administração de Desoxirribonuclease aerolizada (DNAse) têm sido propostas. Entretanto, até o presente, a eficácia desse tratamento tem sido questionável^[85,86].

A amplificação do espectro de estudos que desenvolvam compostos e/ou novas estratégias de combate ao hRSV é fundamental para reduzir as infecções e controlar a doença, principalmente em locais com grande fluxo de indivíduos suscetíveis, tais como hospitais e creches. As infecções causadas pelo hRSV são um problema mundial ainda sem solução, gerando grande impacto nos sistemas de saúde pública e interrompendo a vida de crianças e idosos.

Nesse sentido, o atual desafio é produzir uma vacina eficaz e de ampla proteção, capaz de induzir a imunidade para os dois subtipos de hRSV (A e B), especialmente em idosos, crianças e recém-nascidos, nos quais o índice de reinfecção é alto devido à imaturidade do sistema imunológico, ou descrever uma droga capaz de minimizar as complicações decorrente da infecção e, consequentemente, reduzir os índices de hospitalizações e mortes associadas as infecções agudas do trato respiratório inferior, causadas pelo hRSV.

2 Hipótese

Enzimas granulares neutrofílicas secretadas durante a formação das NETs no decorrer da infecção por hRSV interagem com as proteínas de superfície do vírion, limitando sua replicação.

3 Objetivos

- Objetivo principal:
 - Descrever a ação direta de proteínas provenientes das armadilhas extracelulares neutrofílicas no hRSV in vitro.

- Objetivos secundários:
 - Determinar a citotoxicidade (CC50) de proteínas provenientes das NETs: Mieloperoxidase, Proteinase 3, Catepsina G e Elastase em culturas de células HEp-2.
 - Descrever a formação de sincícios do hRSV em monocamadas de células HEp-2 através de imagens panorâmicas.
 - Quantificar a redução da formação de sincícios induzida pela presença das proteínas presentes na NETs.
 - Determinar os índices de proteção anti-hRSV de proteínas das NETs sobre células HEp-2 (CP50 e CE50).
 - Avaliar a interação das proteínas presentes nas NETs com a proteína de fusão F.
 - Determinar o efeito antiviral da Proteinase 3, Catepsina G e Elastase.

4 Desenho Experimental



Figura 6 – Desenho experimental. Os ensaios com as proteínas provenientes das NETs foram realizadas em três etapas: efeito dessas proteínas sob a morfologia e viabilidade de células HEp-2 (destacado em azul); efeito dessas proteínas sob a replicação in vitro do hRSV (destacado em vermelho); e se as proteínas presentes nas NETs interagem diretamente com a proteína viral de fusão (destacado em verde). MTT, ensaio de viabilidade celular inferido pela metabolização tetrázolio; CC50, concentração em que a viabilidade celular é reduzida em 50%; PFU, do inglês *plaque forming units* (unidades formadoras de placas). Fonte: o autor.

5 Métodos

5.1 Células HEp-2

5.1.1 Cultura

Células HEp-2 (ATCC[®] CCL-23[™]) obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ ref. 0101) foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (Corning ref. 3290) incubadas em estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂ em meio de cultivo DMEM F12 (Sigma ref. D8900) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab ref. 0521-500) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Gibco[®] ref. 15240-062). As HEp-2 são permissivas e usualmente empregadas na propagação do hRSV^[87,88].

5.1.2 Ensaio de Viabilidade

A viabilidade das monocamadas de HEp-2 foi mesurada pela redução do 2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole;bromide (MTT) em N'-anilino-N-[(4,5-dimethyl-1,3-thiazol-2-yl)imino]benzenecarboximidamide (formazana), normalmente conhecido como ensaio de viabilidade celular por MTT. Em resumo, o sobrenadante dos poços foi substituído por 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL, Sigma ref. M5655) em meio de cultivo DMEM F12 (Sigma ref. D2906) e incubado a 37 °C e 5% de CO₂. Após 2 horas o sobrenadante foi substituído por 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma ref. D5879) e homogeneizado até completa solubilização dos cristais de formazana. A absorbância das amostras foram mensuradas por leitor de placas (Thermo ref. 51119000) em filtro de 560 nm^[89].

5.2 Vírus Sincicial Respiratório Humano

5.2.1 Estoque

O Ortopneumovírus Humano (cepa *long*), também conhecido como Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV), foi cedido pelo Dr. Eurico de Arruda Neto (prof. titular de Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP). O vírus foi propagado em monocamadas de células HEp-2 cultivadas em meio DMEM-F12 (Sigma ref. D8900) com 2% SFB e recolhido por raspagem após extensa formação de sincícios (cerca de 60% da monocamada, 4 dias pós-infecção). O coletado foi ressuspensão por agitação e passou por 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A suspensão viral foi centrifugada e o sobrenadante diluído (1:1) em solução de estoque viral (20% de SBF e 20% trealose em DMEM-F12), aliquoteado e acondicionado em tanque de nitrogênio até o momento do uso^[90].

5.2.2 Titulação

Todos estoques virais foram congelados por no mínimo 7 dias após coleta e descongelados somente no momento do uso. O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimm-Breschkin^[7] e o valor da concentração que reduz a viabilidade celular em 50% (TCID₅₀)^[91] foi obtida pela interpolação de uma curva polinomial criada pela função `geom_smooth` no RStudio[®] e definido como sendo 0,6 μ L do estoque ou 2400 PFU (*plaque-forming unit*) por poço.

5.3 Ribavirina

A Ribavirina (1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-1,2,4-triazole-3-carboxamide) foi adquirida na forma de cápsulas com 200 mg (Schering-Plough, Rebetol[®]) e solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma ref. D5879), aliquoteada e estocada em freezer -80 °C até o momento do uso.

5.4 Palivizumabe

O anticorpo monoclonal Palivizumabe foi adquirido comercialmente na forma de pó liofilizado (Synagis[®], AbbVie Inc). A diluição e estocagem foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

5.5 Proteínas Isoladas

5.5.1 Proteína de Fusão Recombinante (r hRSV F)

A proteína de fusão recombinante do Ortopneumovírus Humano (r hRSV F) foi adquirida comercialmente (Sino Biological ref. 11049-V08B) na forma liofilizada. A diluição e estocagem foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

5.5.2 Proteínas Neutrófilicas

As proteínas neutrófilicas utilizadas foram isoladas a partir de leucócitos expectorados e foram adquiridas comercialmente na forma liofilizada: Mieloperoxidase (EPC ref. MY167), Proteinase 3 (EPC ref. ML734), Catepsina G (EPC ref. SG623) e Elastase (EPC ref. SE563). A solubilização e estocagem de cada enzima foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

5.6 Determinação da Citotoxicidade

Células HEp-2 (5×10^4 /poço) ressuspensas em meio de cultivo DMEM F12 foram semeadas em placas de 96 poços (Corning ref. 3595) e incubadas em estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas ou até atingirem confluência mínima de 80%. As monocamadas receberam diversas concentrações das proteínas neutrófilicas ressuspensas em meio de cultivo DMEM F12 (diluições seriadas na base 2), sempre com volume final de 100 µL/poço. Após 72 horas a viabilidade da monocamada foi mensurada pelo ensaio de colorimétrico de MTT. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de viabilidade

pela equação 5.1. Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo (CC) foram consideradas como 100% viáveis (viabilidade máxima nas condições testadas).

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \left(\frac{DO_T}{DO_{CC}} \right) * 100 \quad (5.1)$$

Sendo:

DO_T Densidade ótica do grupo teste

DO_{CC} Densidade ótica do controle celular

Após conversão, o valor da CC50 (concentração capaz de reduzir a viabilidade das células em 50%) de cada uma das proteínas foi determinado, quando possível, pela interpolação de uma curva polinomial criada pela função `geom_smooth` no RStudio[®].

5.7 Atividade Anti-hRSV

5.7.1 Formação de Sincícios (Imagens)

Em alguns experimentos de Proteção Celular, antes de realizar o ensaio de viabilidade por MTT, a monocamada foi fotografada para análise visual e quantitativa de sincícios.

5.7.1.1 Construção das Panorâmicas

As fotos da monocamadas foram registradas por uma câmera digital acoplada em microscópio óptico invertido (*Nikon* TS100) e dessaturadas usando as configurações “Média” com correção de brilho e contraste no editor GIMP. As imagens panorâmicas foram criadas pela projeção do tipo Mercator no software Autopano pro[®]. A proporção foi ajustada pelo formato e dimensões dos poços da placa de cultivo.

5.7.1.2 Quantificação dos Sincícios

O contraste das imagens foi ajustado para evidenciar (destacar) as estruturas mais escuras da monocamada (predominantemente sincícios). Todos ajustes foram realizados exatamente do mesmo modo em todas as panorâmicas do mesmo ensaio, sempre com intuito de evidenciar os sincícios. A porção central das panorâmicas (melhor contraste) foi convertida em imagem do tipo binário pelo software IMAGEJ usando configurações personalizadas. Com as imagens padronizadas e em formato binário foi possível utilizar a ferramenta “Analisar Partículas” do IMAGEJ para calcular o número, forma, tamanho e posição do sincícios em cada imagem.

5.7.2 Proteção Celular

Células HEP-2 (5×10^4 /poço) ressuspensas em meio de cultivo DMEM F12 foram semeadas em placas de 96 poços (Corning ref. 3595) e incubadas em estufa umedecida a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas ou até atingirem confluência mínima de 80%. Cada proteína (várias concentrações, seriada base 2) foi incubada com a TCID₅₀ (como especificado em 5.2.2). Após duas horas as células receberam a solução proteína + inóculo viral ($0,6 \mu\text{L}/\text{poço}$) com diluição mínima de 1:10 em DMEM F12, sempre com volume final de $100 \mu\text{L}/\text{poço}$. Após 72 horas a viabilidade da monocamada foi mensurada pelo ensaio de colorimétrico de MTT. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de Proteção Celular (Equação 5.2). Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo (CC) foram consideradas como 100% de proteção, células que receberam somente o inóculo viral (controle viral) foram consideradas como 0% de proteção.

$$\textit{Proteção Celular} (\%) = \left(\frac{DO_T - DO_{CV}}{DO_{CC} - DO_{CV}} \right) * 100 \quad (5.2)$$

Sendo:

- DO_T Densidade ótica do grupo teste
 DO_{CV} Densidade ótica do controle viral
 DO_{CC} Densidade ótica do controle celular

5.7.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O perfil eletroforético da proteína F viral pós-incubação com as enzimas aqui estudadas foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% composto por água, acrilamida 30% (Bio-Rad ref: 1610156), solução Tris 1.5 M pH 8,8, Dodecil sulfato de sódio 10% (Bio-Rad ref: 1610301), persulfato de amônio 10% (Bio-Rad ref: 1610700) e TEMED (Bio-Rad ref: 1610801).

Para tanto, 500 ng de proteína F (r hRSV F) foi incubada por 2 horas a 37 °C com diferentes concentrações das enzimas. Ao final do período de incubação, as amostras foram aplicadas no gel. Paralelamente, foram também aplicados em poços individuais: marcador de proteínas *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad ref: 1610374), proteína F e as demais enzimas. Inicialmente, a tensão foi mantida em 80 V até que as proteínas migrassem pelo gel de empilhamento. Ao dar entrada no gel de resolução, a tensão foi aumentada para 100 V. Ao final da corrida, os géis foram corados por Nitrato de Prata. Em resumo, 10 minutos em solução de metanol 40%, ácido acético 9,6% e formol 0,004%; lavagens com solução de etanol 50%; 10 minutos em solução de tiosulfito de sódio 0,03 g em 100 mL de água; revelação em solução de nitrato de prata 0,2 g em solução de 0,007% de formol; paralisação da reação em solução de carbonato de sódio 6 g em solução 0,05% de formol seguido por solução de metanol 40% e ácido acético 9,6%; e, finalmente, 5 minutos em solução de metanol 50%. O gel foi mantido submerso em água destilada. A densitometria das bandas aparentes no gel foi calculada pela função “Plot Lanes” do software IMAGEJ.

5.7.4 Ensaio de Redução de Placa

Células HEp-2 (3×10^5 /poço) ressuspensas em meio de cultivo DMEM F12 foram semeadas em placas de 24 poços (Corning ref. 3524) e incubadas em estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas ou até atingirem

confluência mínima de 90%. Cada proteína (várias concentrações, seriada base 2) foi incubada por 2 horas com inóculo viral compatível com a visualização das placas de lise (5.2.2). Em seguida, o meio de cultivo foi substituído pela solução proteína + inóculo, com diluição mínima de 1:100 em meio de cultivo DMEM F12, sempre com volume final de 500 μ L/poço. Após 2 horas o o sobrenadante foi substituído por 2 mL de DMEM F12 acrescido de 0,2% de agarose (Sigma ref. A9539). Após 5 dias de incubação a 35 °C e 5% de CO₂, o sobrenadante foi acrescido 1 mL de formaldeído 3% (Sigma ref. F8775) para fixação da monocamada. Após 24 horas, o sobrenadante foi descartado por batidas firmes e substituído por 1mL de solução 0,05% de vermelho neutro (Sigma ref. N4638) para coloração das células. Após 4 horas o sobrenadante foi descartado e a monocamada foi lavada com água destilada até completa remoção do excesso de corante. A placas de lise foram fotografadas em câmera digital acoplada em lupa com auxílio de um negatoscópio (Biotron ref. USLT) e contadas com auxílio do software IMAGEJ

5.8 Softwares

5.8.1 Elaboração do Texto

Essa tese foi escrita em L^AT_EX com auxílio do editor de texto *Texmaker* em conformidade com a suíte abnT_EX2 e estruturada pelo template fornecido pela biblioteca do IBILCE (Template Pós-graduação - Doutorado).

5.8.2 Manipulação das Imagens

As imagens vetoriais foram manipuladas com auxílio do editor INKSCAPE versão 0.92 e exportadas como documento portátil (*Portable Document Format*, PDF). Os géis de eletroforese e a contagem de sincícios foram editados e manipulado pelo software IMAGEJ versão 1.8. As imagens montadas por sobreposição de camadas foram finalizadas com auxílio do editor de imagens GIMP versão 2.10. As montagens panorâmicas foram realizados pelo algoritmo AutoStitch no software Autopano pro[®].

5.8.3 Análises Estatísticas

Os dados originalmente organizados em tabelas no formato CSV foram importados e convertidos em *data frame* pelo software pandas via função `pandas.read_csv`. Os demais cálculos estatísticos foram realizados pelo software SciPy. A normalidade dos dados foi aferida pelo teste de Shapiro-Wilk (função: `scipy.stats.shapiro`), a variância foi avaliada pelo ANOVA um fator (função: `scipy.stats.f_oneway`) e Kruskal–Wallis um fator (função: `scipy.stats.kruskal`). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5.8.4 Tabelas e Gráficos

Os dados e cálculos estatísticos foram organizados em planilhas eletrônicas do software Calc da suíte **LibreOffice** versão 6.4.2 (Apêndice N). Os gráficos foram realizados com auxílio do RStudio[®] versão 1.2.5 e plotados pelo pacote `ggplot2`.

6 Resultados e Discussão

6.1 Determinação da Citotoxicidade

Desde os primórdios, a civilização humana tem utilizado os mais variados elementos da natureza com finalidade curativa. Independentemente da origem (vegetal, animal ou mineral) ou via de administração, a quantidade da substância sempre foi fator determinante para que o organismo a interprete como remédio ou veneno.

“All things are poison and nothing (is) without poison; only the dose makes that a thing is no poison”, (PARACELSUS, séc. XV).

Até mesmo a água, composto responsável pelo suporte de todas as formas de vida conhecidas e que responde por mais da metade do peso do corpo humano, exerce efeitos considerados altamente tóxicos quando ingerida em excesso, podendo causar desde diarreia, vômito e somatização até delírio, convulsão e óbito^[92].

Determinar a quantidade necessária para que uma substância induza efeitos nocivos, embora etapa essencial para evidenciar os seus possíveis efeitos benéficos, não constitui tarefa simples, principalmente em condições em que o contexto celular ou tecidual se difere do fisiológico como ocorre nos ensaios *in vitro* ou *ex vivo*.

Para evitar a sobreposição de efeitos nocivos diversos, foram criados termos que especificam o tipo de nocividade, hepatotóxico indica que a substância é nociva para o fígado, neurotóxico indica efeito nocivo ao sistema nervoso etc. Quando se refere a nocividade de uma substância ou composto em cultura de células, seja reduzindo o metabolismo celular ou comprometendo a estrutura de membranas, emprega-se o termo citotoxicidade.

Existem diversos ensaios capazes de mensurar viabilidade de células em cultura, os mais empregados atualmente são do tipo colorimétrico como o MTT (descrito na Seção 5.1.2), XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) e MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy

methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Esses ensaios são baseados na conversão do sal de tetrazólio em formazana realizada por enzimas intracelulares normalmente associadas a membrana mitocondrial e ao metabolismo celular^[89].

Nesse trabalho foi utilizado um ensaio colorimétrico que se baseia na metabolização do MTT (coloração amarelada) pela succinato desidrogenase em formazana (coloração roxo escuro) como ilustra a Figura 7. Os ensaios de viabilidade baseados em MTT são amplamente empregados em rotinas de monitoramento ou *screenings* devido ao seu baixo custo, simplicidade de execução e robustez^[91].

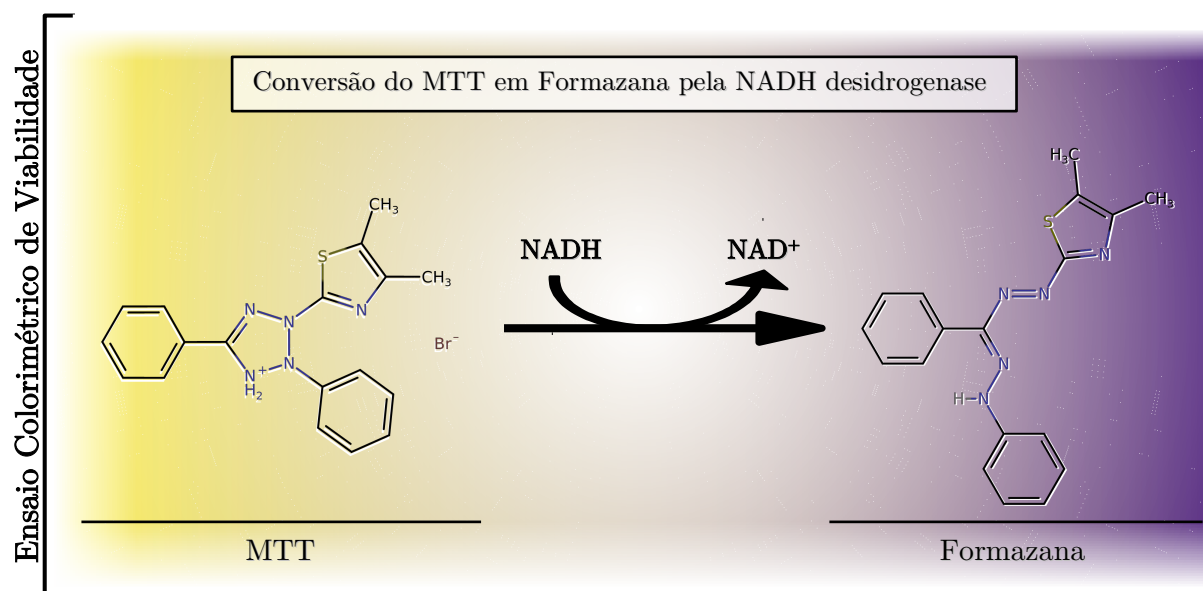


Figura 7 – Redução do sal de tetrazólio em formazana. O sal de MTT penetra nas células onde é convertido em formazana por enzimas associadas à membrana das mitocôndrias. A viabilidade pode ser inferida como sendo diretamente proporcional a formação de formazana, quanto maior a intensidade da coloração roxo escura, maior a viabilidade das células. O dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) e oxidado (NAD⁺). Fonte: o autor.

A redução do MTT ocorre somente em células metabolicamente ativas e o nível de atividade dessas células pode ser correlacionado com a quantidade de formazana produzida^[93]. A formazana do MTT é insolúvel em água e se acumula

no citosol, formando cristais que devem ser solubilizados para correta quantificação por absorvância. Ao determinar a quantidade de formazana produzida por uma monocamada de um tipo celular em condição controle (ex: células e meio de cultivo), é possível determinar a redução da formazana gerada por uma monocada do mesmo tipo exposta a um composto, ou seja, estabelecer o efeito citotóxico do composto sobre aquele tipo celular.

A citotoxicidade de 4 proteínas presentes nas NETs foi determinada pelo Ensaio de Viabilidade: Mieloperoxidase (EPC ref. MY167), Proteinase 3 (EPC ref. ML734), Catepsina G (EPC ref. SG623) e Elastase (EPC ref. SE563). Determinou-se também a citotoxicidade sobre culturas de células HEp-2 das duas únicas drogas aprovadas pelo FDA para o tratamento de hRSV, o Palivizumabe e a Ribavirina.

Os valores das absorvâncias — que são diretamente proporcionais a conversão do intracelular do MTT em formazana — obtidos durante o Ensaio de Viabilidade foram normalizados pela média das absorvâncias do controle celular e convertidos porcentagem (Equação 5.1). A concentração capaz de reduzir o metabolismo celular em 50% (CC50) foi determinada quando possível para cada uma das proteínas.

6.1.1 CC50: Ribavirina

A Ribavirina (1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxy-5-(hidroximetil)oxolan-2-yl]-1,2,4-triazole-3-carboxamida) é um análogo de guanossina sintético com reconhecida atividade antiviral contra hepatites A, B e C, influenza A e B, parainfluenza e herpes (Figura 8) [80,94,95]. Sua síntese foi descrita no início dos anos 70 e seu uso como droga para o tratamento de infecções por hRSV só foi aprovado em 1985 pelo FDA [96].

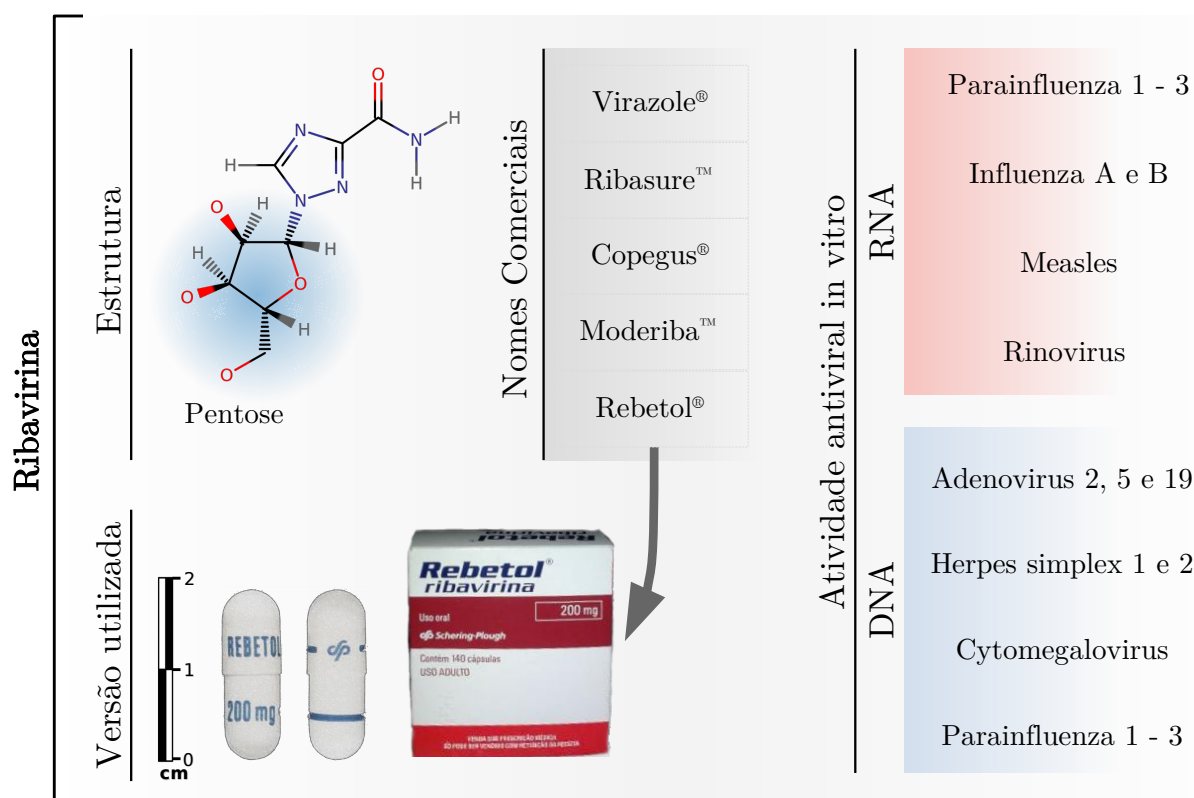


Figura 8 – Detalhes da Ribavirina. A Ribavirina possui estrutura semelhante a dos nucleosídeos, existem diversas versões comerciais, sendo as mais comuns as de uso oral. Possui comprovada atividade contra diversos vírus de DNA e RNA. Fonte: o autor.

Nucleosídeos sintéticos geralmente apresentam baixa especificidade e, portanto, tendem a ser excessivamente citotóxicos, o que limita seu uso prático. Dentre os nucleosídeos sintéticos com atividade antiviral, a Ribavirina certamente é um dos mais utilizados devido a sua seletividade (baixa citotoxicidade) e seu amplo espectro de ação, possuindo diversos mecanismos antivirais descritos. Um dos principais mecanismos é a substituição de nucleosídeos, alterando a

formação convencional do mRNA viral, induzindo mutações e/ou prejudicando a síntese de proteínas e, conseqüentemente, reduzindo a infectividade do vírion.

Antes de avaliar o efeito anti-hRSV da Ribavirina faz-se necessário estabelecer sua citotoxicidade em cultura de células HEP-2. Monocamadas confluentes foram incubadas com diferentes concentrações de Ribavirina diluídas em meio de cultivo DMEM-F12 por 72 horas. Em seguida o efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade, os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem da viabilidade celular pela Equação (5.1).

A CC50 da Ribavirina foi determinada pela interpolação de uma curva polinomial e seu valor estabelecido em 1400 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 9). A determinação da CC50 da Ribavirina permite que seu efeito seja avaliado corretamente, evitando uma possível sobreposição de sua ação antiviral com seu efeito citotóxico^[80].

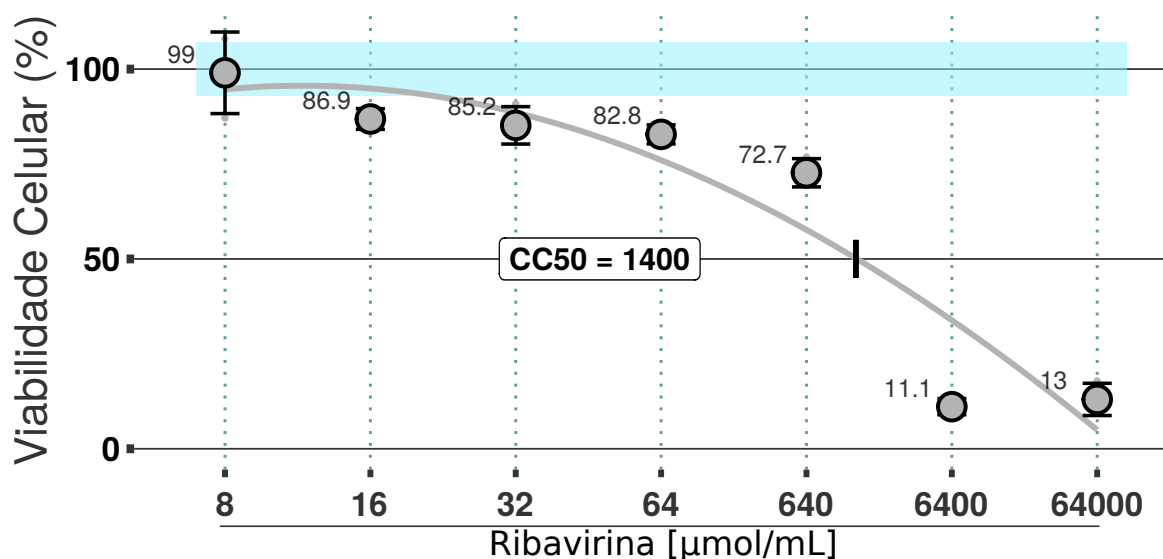


Figura 9 – Determinação da CC50 para a Ribavirina. Monocamadas de HEP-2 foram incubadas com diversas concentrações de Ribavirina (8–64000 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas, o metabolismo celular foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias foram normalizados pela média do controle celular. O retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 4. Fonte: o autor.

A citotoxicidade da Ribavirina determinada nas condições descritas, embora as eventuais divergências de protocolo e fabricante, compactuam com os valores registrados pela literatura^[97–99].

6.1.2 CC50: Palivizumabe

O Palivizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, criado ao longo de mais de 10 anos via técnica de DNA recombinante pela MedImmune LLC. Atualmente, é a única droga aprovada para uso profilático da infecção aguda do trato respiratório inferior causada pelo hRSV e deve ser empregada apenas em pacientes considerados de alto risco^[100,101].

“prevention of serious lower respiratory tract disease caused by RSV in children at high risk of RSV disease”, (FDA, 1996).

Desenvolvido para se ligar com alta afinidade no sítio antigênico II da proteína de fusão F do hRSV (Figura 10), o Palivizumabe possui capacidade neutralizante e inibitória, reduzindo drasticamente a capacidade de internalização da partícula viral e a formação de sincícios^[78,102].

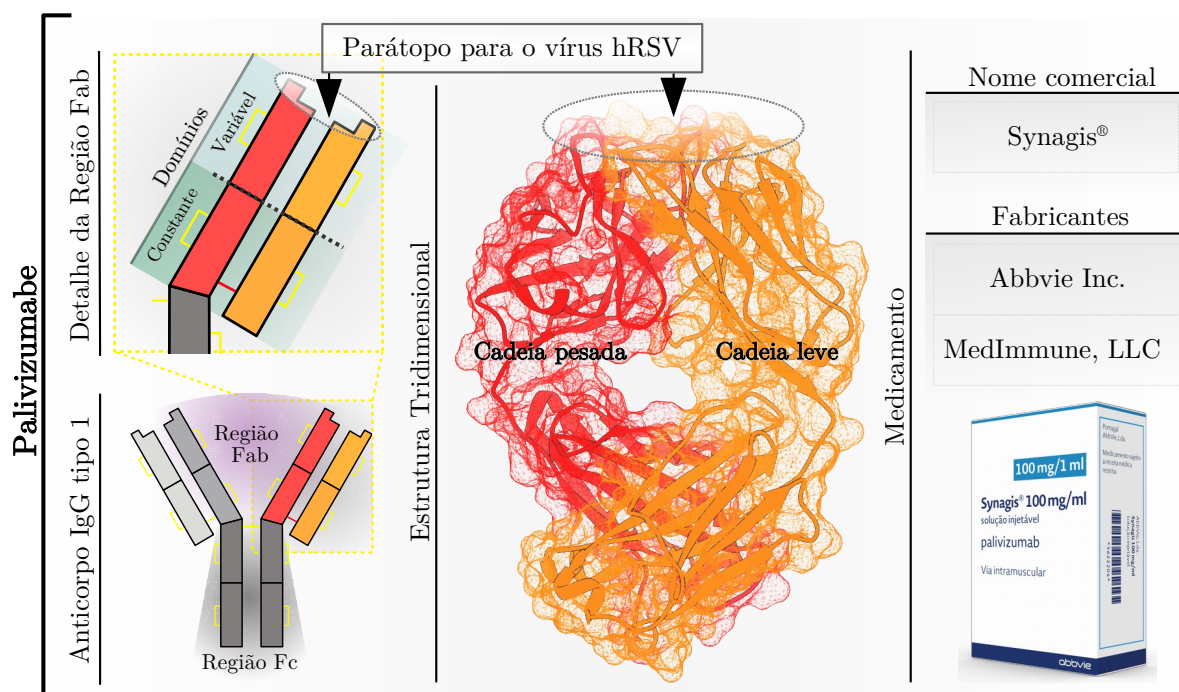


Figura 10 – Estrutura do Palivizumabe. O Palivizumabe corresponde a porção Fab de um anticorpo IgG humanizado do tipo 1. Sua estrutura tridimensional complexada com a proteína de fusão foi determinada por Difração de Raios-X (PDB: 5J3D). Embora seja a única droga aprovada para o tratamento profilático, sua produção é restrita a poucos laboratórios e seu custo considerado elevado. Fonte: o autor.

A citotoxicidade do Palivizumabe foi estabelecida nas mesmas condições do protocolo de Proteção Celular, exceto a etapa de infecção. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2) com diversas concentrações de Palivizumabe diluído em meio de cultivo DMEM-F12 (sempre com volume final de $100\text{ }\mu\text{L/poço}$) por 72 horas. Em seguida o efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade, os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem da viabilidade celular pela Equação (5.1).

As células HEp-2 não apresentaram alteração significativa no metabolismo quando expostas ao Palivizumabe, mesmo na maior concentração testada, o Ensaio de Viabilidade não detectou redução significativa, deste modo o valor da CC50 do Palivizumabe em células HEp-2 não foi determinado (Figura 11).

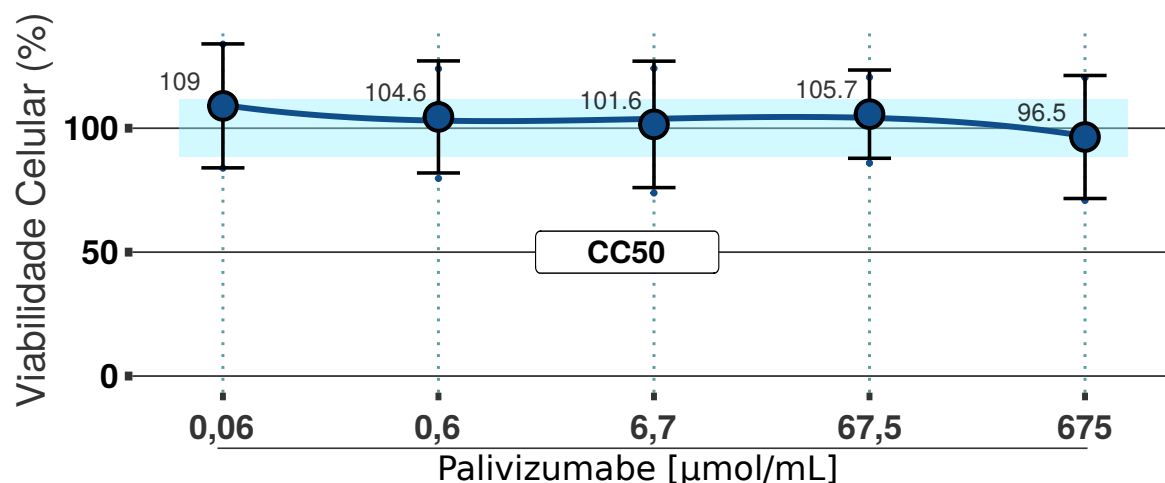


Figura 11 – Determinação da CC50 do Palivizumabe. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Palivizumabe ($0,06\text{--}675\text{ }\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 5. Fonte: o autor.

6.1.3 CC50: Mieloperoxidase

A Mieloperoxidase Humana é uma proteína codificada pelo gene MPO (lócus 17q22), sua principal fonte são os grânulos azurófilos (primários) dos neutrófilos. Nessas células, a massa proteica seca representada pela Mieloperoxidase Humana pode chegar a 5%, equivalendo aproximadamente a 4 μg por 10^6 neutrófilos^[103].

Em relação a estrutura, a Mieloperoxidase é um homodímero com peso molecular de aproximadamente 140 kDa composta por 4 cadeias, sendo 2 leves (cerca de 15 kDa) e 2 pesadas cujo peso molecular pode variar em função do grau de glicosilação. Os monômeros são unidos via ponte dissulfeto na cisteína 153, cada cadeia pesada está ligada a uma protoporfirina IX de ferro modificada^[104] (Figura 12).

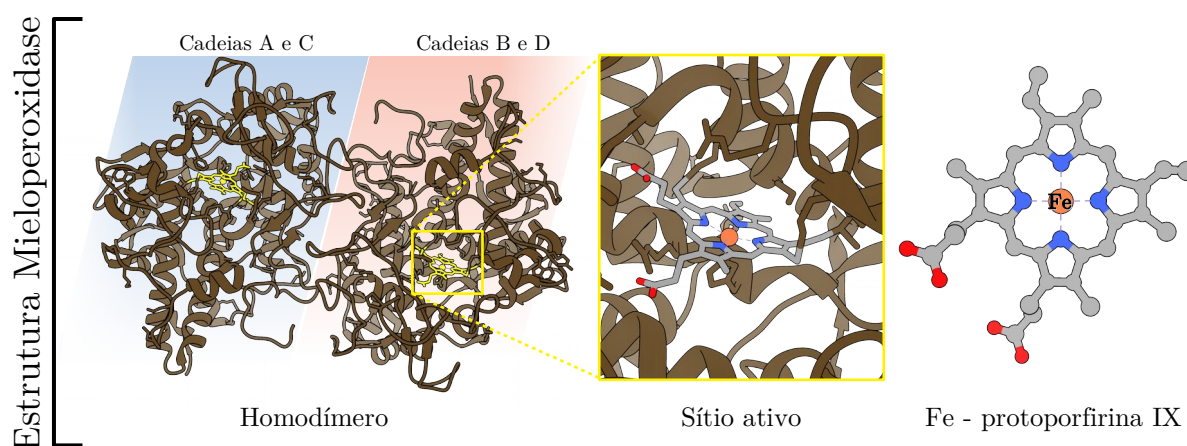
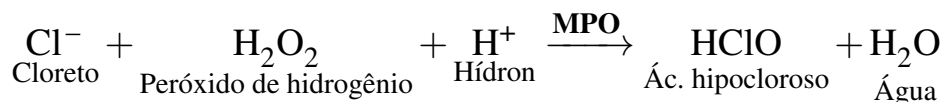


Figura 12 – Estrutura da Mieloperoxidase. Aspecto geral do homodímero Mieloperoxidase (PDB: 1CXP). Os monômeros estão marcados em azul e vermelho, o sítio ativo está destacado em amarelo e por último, detalhes da estrutura da Fe-protoporfirina IX. Fonte: o autor.

A Mieloperoxidase é classificada pelo *Enzyme Commission* (EC 1.11.2.2) como uma peroxidase capaz de catalizar, dependendo do contexto, reações que produzem compostos oxidantes de grande relevância biológica intracelularmente (lisossomos) e extracelularmente, dentre eles, espécies extremamente reativas como o trióxigênio (O_3), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico (NO)^[104]. A maior parte da competência antimicrobiana atribuída a Mieloperoxidase se deve a grande capacidade reativa dos compostos e intermediários

produzidos, principalmente no contexto inflamatório, como por exemplo o ácido hipocloroso^[105]:



A Mieloperoxidase utilizada nesse trabalho foi purificada a partir de leucócitos humanos e adquirida comercialmente na forma liofilizada (EPC ref. MY167). O protocolo empregado para a determinação da CC50 da Mieloperoxidase foi o mesmo utilizado na determinação da CC50 do Palivizumabe.

Foram testadas várias concentrações (0,5–32 $\mu\text{mol/mL}$) e nenhuma redução significativa (próxima de 50%) foi detectada pelo Ensaio de Viabilidade. A média dos valores foi de 83–91% sem qualquer tendência de redução na viabilidade, mesmo em concentrações mais altas (16 e 32 $\mu\text{mol/mL}$) os valores de viabilidade sem mantiveram em torno de 88%, portanto, a CC50 da Mieloperoxidase em células HEP-2 não pode ser determinada (Figura 13).

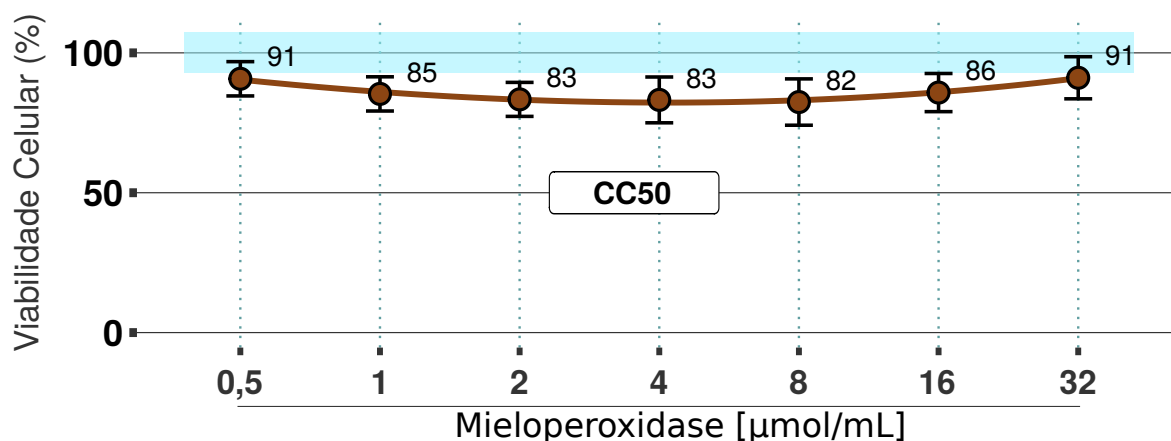


Figura 13 – Determinação da CC50 da Mieloperoxidase. Monocamadas de HEP-2 foram incubadas com diversas concentrações de Mieloperoxidase (0,5–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 6. Fonte: o autor.

6.1.4 CC50: Proteinase 3

A Proteinase 3, também conhecida como Mieloblastina Humana ou Proteinase Neutrófila 3, é uma proteína codificada pelo gene PRTN3 (locus 19p13.3) que pode ser encontrada em monócitos, basófilos e mastócitos, mas sua principal fonte são os grânulos neutrofílicos (azurófilos e específicos)^[106]. Descrita inicialmente como agente indutor de enfisema pulmonar em hamsters, a Proteinase 3, diferentemente da Mieloperoxidase e Elastase, é constitutivamente expressa na membrana de neutrófilos inativos (em estado de repouso)^[107,108].

Em comparação a Mieloperoxidase (cerca de 140 kDa e 4 cadeias), a Proteinase 3 é uma glicoproteína pequena de cadeia única com cerca de 221 resíduos e peso molecular em torno de 30 kDa^[109]. Possui 2 sítios de glicosilação e 4 pontes dissulfeto, sendo uma das pontes (cisteína 42-58) subsequente a um dos resíduos (histidina 57) que constitui a tríade do sítio catalítico (Figura 14).

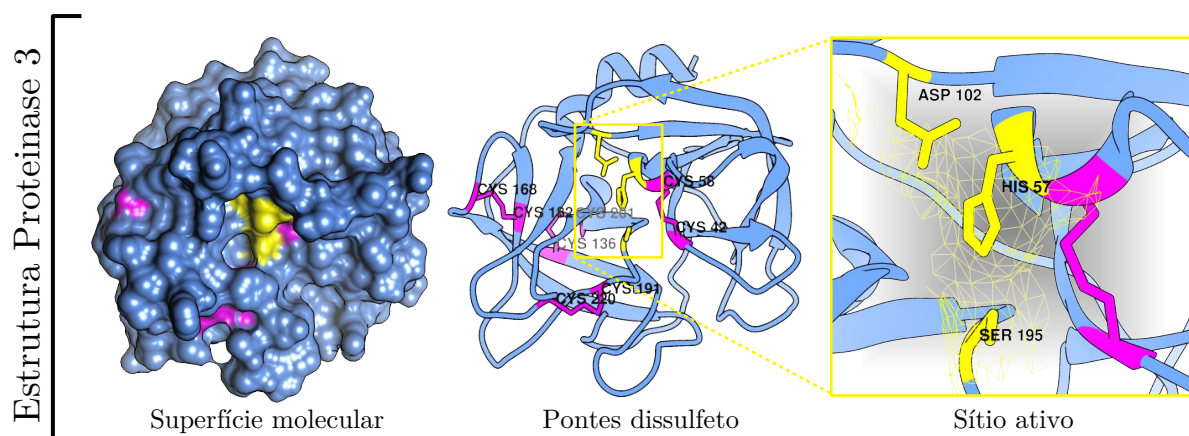


Figura 14 – Estrutura da Proteinase 3. Aspecto da superfície molecular da Proteinase 3 (PDB: 1FUJ). As pontes dissulfeto estão destacadas em rosa e os resíduos que compõem a tríade do sítio ativo em amarelo. Fonte: o autor.

Embora a numeração dos resíduos possa variar de acordo com a referência utilizada, geralmente a ponte dissulfeto 191-220 representada na Figura 14 também está presente na Elastase e, devido a distinções na estrutura primária, ausente na Catepsina G.

A Proteinase 3 é classificada pelo *Enzyme Commission* (EC 3.4.21.76) como serino protease (serina endopeptidase) capaz de hidrolisar a elastina,

importante proteína capaz de conferir elasticidade e sustentação a diversos tipos de tecido, bem como outras centenas de substratos já descritos na literatura^[110].

A Proteinase 3 utilizada nesse trabalho é oriunda de leucócitos humanos e foi adquirida comercialmente na forma liofilizada, o manuseio, diluição e estoque foram realizados de acordo com as especificações do fabricante (EPC ref. ML734).

A citotoxicidade da Proteinase 3 sob células HEp-2 foi determinada seguindo os mesmos moldes dos demais ensaios dessa seção, em todas as concentrações testadas (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) a viabilidade celular ficou acima dos 50%, com valores entre 71–90% (Figura 15).

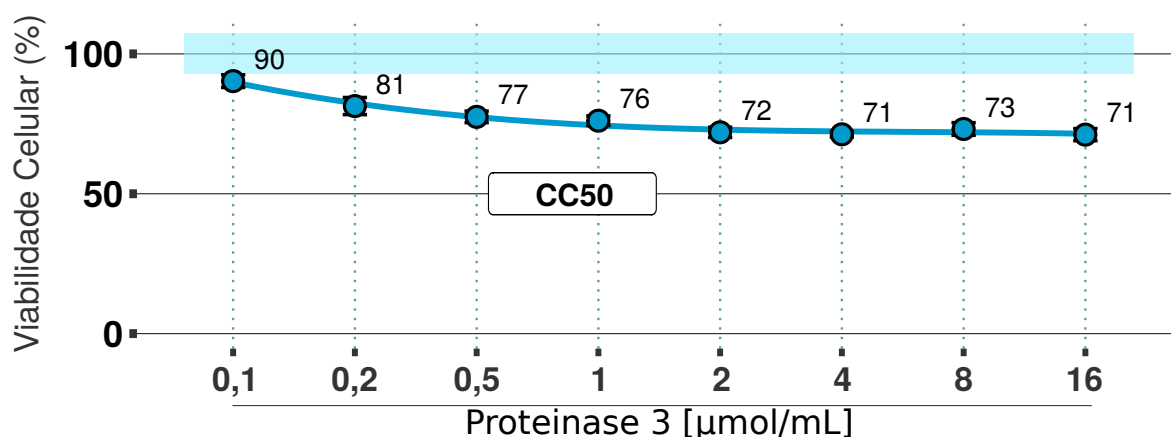


Figura 15 – Determinação da CC50 da Proteinase 3. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Proteinase 3 (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 7. Fonte: o autor.

Considerando que, mesmo na maior concentração testada (16 $\mu\text{mol/mL}$) a viabilidade média se manteve próximo de 70%, o valor da CC50 da Proteinase 3 nas condições descritas não foi estabelecido (Figura 15), nesse caso, toda a faixa de as concentrações testadas na determinação da CC50 da Proteinase 3 (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) poderão ser utilizadas nos em ensaios posteriores.

6.1.5 CC50: Catepsina G

A Catepsina G, também denominada Proteinase neutra e Protease vimentina específica, é codificada pelo gene CTSG (locus 14q12) e que está presente em células derivadas do progenitor mieloide como monócitos e neutrófilos. Pode ser encontrada na superfície de neutrófilos ativos, mas sua principal fonte são os grânulos azurofílicos ^[108].

Em relação a estrutura, a Catepsina G se assemelha a Proteinase 3, é uma glicoproteína de cadeia única com cerca de 224 resíduos e peso molecular de aproximadamente 24 kDa. Embora homóloga as demais serino proteases (Proteinase 3 e Elastase), sua estrutura primária se distingue principalmente pela elevada incidência relativa de resíduos com carga positiva (Lisina, Arginina e Histidina) descompensada, o que contribui para seu elevado ponto Isoelétrico ($pI \approx 12$) e corrobora sua grande afinidade por moléculas negativamente carregadas ^[111]. Possui 1 sítio de glicosilação e 3 pontes dissulfeto (Figura 16).

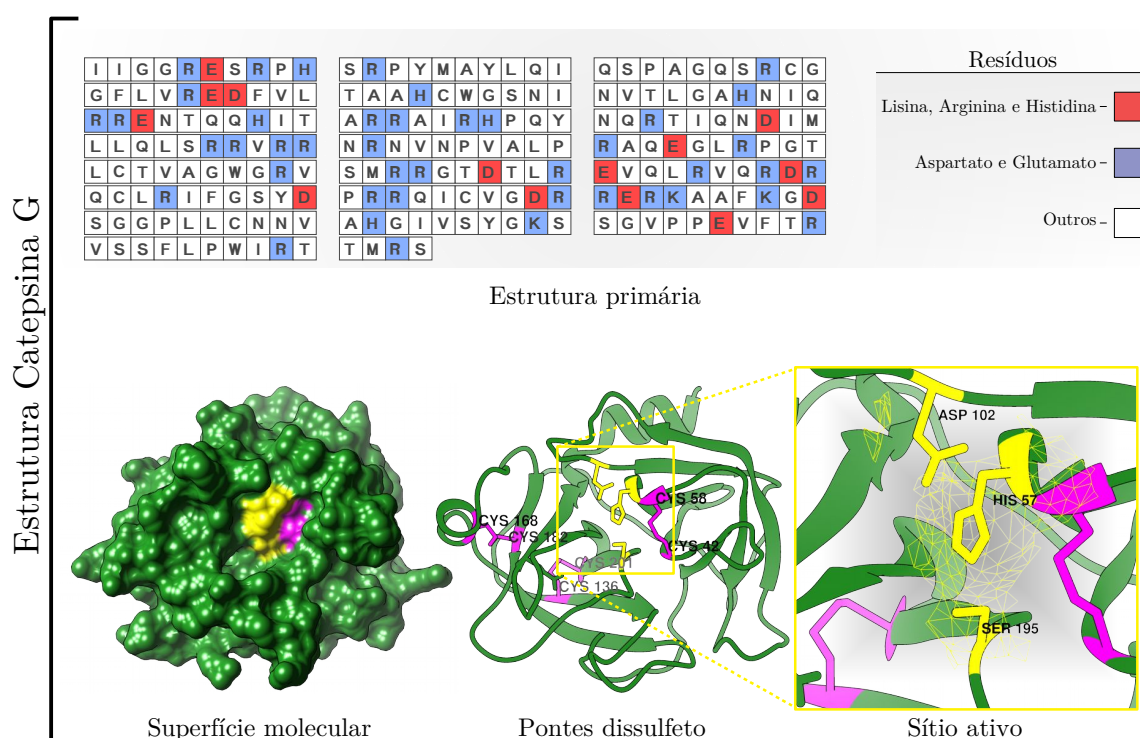


Figura 16 – Estrutura da Catepsina G. Aspecto da superfície molecular da Catepsina G (PDB: 1AU8). As pontes dissulfeto estão destacadas em rosa e o resíduos que compõem a tríade do sítio ativo em amarelo. Fonte: o autor.

A Catepsina G utilizada nesse trabalho foi purificada a partir de leucócitos humanos e adquirida comercialmente na forma liofilizada (EPC ref. SG623). O *Enzyme Commission* (EC 3.4.21.20) a classifica como serino protease (serina endopeptidase) com especificidade de substrato semelhante a Quimotripsina com diversos inibidores descritos.

As células HEp-2 apresentaram redução concentração-dependente da viabilidade quando incubadas com Catepsina G. No intervalo de 0,1 e 4 $\mu\text{mol/mL}$ a viabilidade mensurada foi de 91–67%, nas maiores concentrações testadas (8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$) a média da viabilidade foi de 38,5%. O valor da CC50 para a Catepsina G foi determinado em 8,1 $\mu\text{mol/mL}$ com auxílio da interpolação de uma curva polinomial (Figura 17).

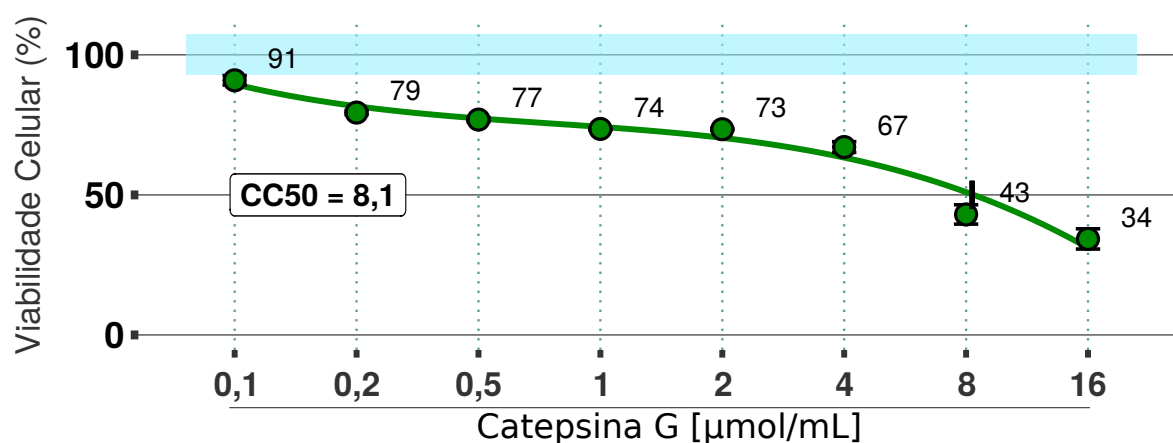


Figura 17 – Determinação da CC50 da Catepsina G. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Catepsina G (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 8. Fonte: o autor.

6.1.6 CC50: Elastase

A Elastase, também denominada Elastase neutrofílica, Elastase leucocitária e Serina-elastase é codificada pelo gene ELANE (locus 19p13.3) e, certamente umas das serino proteases mais estudadas. Descrita pela primeira vez na década de 60 como uma enzima capaz liberar peptídeos solúveis a partir da elastina (insolúvel) [112].

A Elastase pode ser identificada em monócitos, basófilos, mastócitos e na superfície de neutrófilos ativos, sendo os grânulos azurofílicos sua principal principal fonte [113,114]. Apresenta ponto isoelétrico de pI 10,5, menor do que o da Catepsina G (pI 12) e maior do que o da Proteinase 3 (pI 9,5) e, dentre as serino proteases avaliadas, é a enzima mais eficaz em condições de pH elevado (8–8,5) [115].

Em relação a estrutura, a Elastase corresponde mais com a estrutura da Proteinase 3 do que a CTPG, é uma glicoproteínas de cadeia única com cerca de 218 resíduos e peso molecular de aproximadamente 29–33 kDa. Possui 2 sítio de glicosilação nas asparaginas 109 e 159, além de 4 pontes dissulfeto (Figura 18).

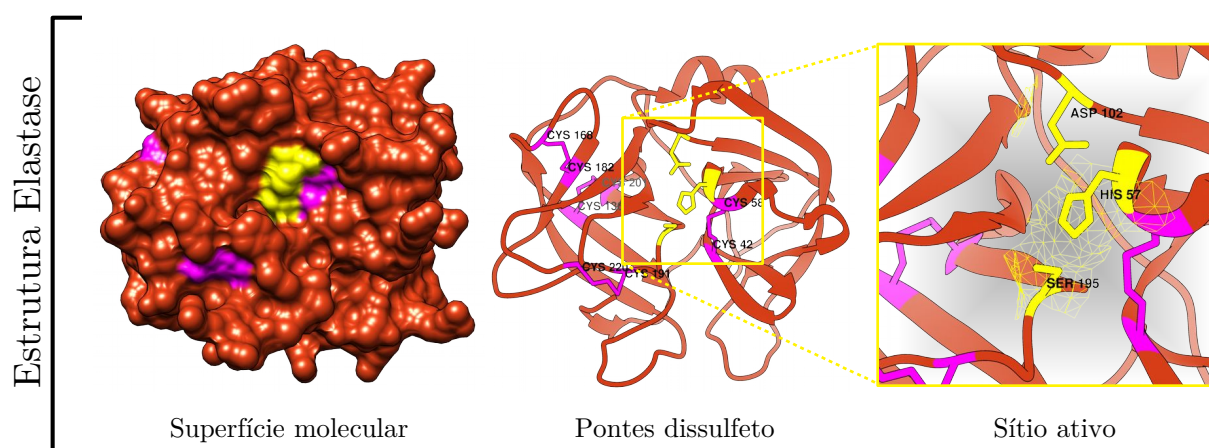


Figura 18 – Estrutura da Elastase. Aspecto da superfície molecular da Elastase (PDB: 3Q76). As pontes dissulfeto estão destacadas em rosa e o resíduos que compõem a tríade do sítio ativo em amarelo. Fonte: o autor.

A Elastase exerce relevante atividade regulatória em diversos mecanismos biológicos, inativando mediadores inflamatórios e degradando o colágeno durante a cicatrização de tecidos lesados [116]. A Elastase utilizada nesse trabalho foi purificada a partir de leucócitos humanos e adquirida comercialmente na forma liofilizada (EPC ref. SE563). O *Enzyme Commission* (EC 3.4.21.37) a classifica como uma serino protease com capacidade de clivar centenas de substratos diferentes.

Monocamadas de células HEp-2 apresentaram redução concentração-dependente da viabilidade quando incubadas com Elastase. Menores concentrações (0,1–8 $\mu\text{mol/mL}$) não induziram relevante efeito tóxico, com viabilidade média de 83%. Nas maiores concentrações testadas (16 e 32 $\mu\text{mol/mL}$) a Elastase induziu relevante toxicidade, reduzindo a média da viabilidade da monocamada nessa faixa a 16%. O valor da CC50 da Elastase foi determinado pela interpolação de uma curva polinomial e estabelecido em 12,1 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 19).

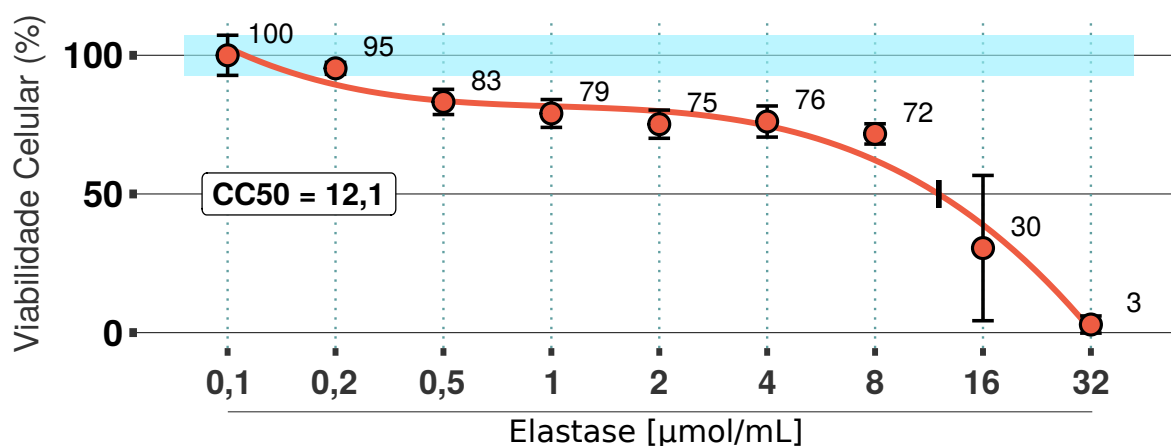


Figura 19 – Determinação da CC50 da Elastase. Monocamadas de HEp-2 foram incubadas com diversas concentrações de Elastase (0,1–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os valores ao lado dos símbolos correspondem as médias e o retângulo azul corresponde a média do controle celular \pm o desvio padrão. Os dados do gráfico constam na Tabela 9. Fonte: o autor.

6.2 Titulação do Estoque Viral

A alíquota de hRSV (cepa *long*) foi amplificada em monocamadas de células HEp-2, colhida, alíquotada e armazenada em tanque de nitrogênio líquido. Foram testados alguns meios de congelamento e o manteve maior virulência após o descongelamento foi o de 20% de SBF e 20% trealose em DMEM-F12^[90].

A titulação viral foi realizada pelo método de *Tissue Culture Infectious Dose 50* (TCID₅₀), em tradução livre “Dose Infecciosa em Cultura de Células 50”^[91]. Nesse tipo de titulação, diluições seriadas da alíquota estoque são usadas como inóculo e o valor da concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% é obtido pela interpolação uma curva polinomial^[117].

O protocolo de titulação deve ser semelhante aos demais protocolos, quanto maior a similaridade, mais robusta e útil será a titulação^[117]. O protocolo empregado na determinação da TCID₅₀ do estoque viral é praticamente idêntico ao protocolo de Proteção Celular (seção 5.7.2), a única ressalva, é que no protocolo de titulação não existe proteína a ser testada.

O valor da TCID₅₀ do estoque viral que foi utilizado em todos os experimentos realizados em placas de 96 poços foi determinado em 0,6 μ L/poço (Figura 20). A determinação da concentração que corresponde a TCID₅₀ contribui para que ocorra evidente diferença nas absorvâncias entre os grupos infectados e o grupo de controle celular com o mínimo possível de vírus. Com o valor de TCID₅₀ de 0,6 μ L/poço (ou 2400 PFU por poço), o protocolo de infecção, que utiliza 20 μ L/poço, garante uma diluição mínima de 30x da solução estoque viral, minimizando eventuais efeitos dos dos componentes dessa solução.

A integridade da monocamada é importante para o Ensaio de Viabilidade e no desenvolvimento in vitro do ciclo replicativo do hRSV. Quando infectada, a monocamada passa a expressar proteínas virais em sua superfície, incluindo a proteína de fusão F^[118]. Além disso, o hRSV possui capacidade de realizar infecção célula-célula e sua replicação será prejudicada caso a camada de células não seja contígua^[4].

Durante a replicação, a ação da proteína de fusão F combinada com a capacidade de infecção célula-célula, criam perturbações capazes de induzir

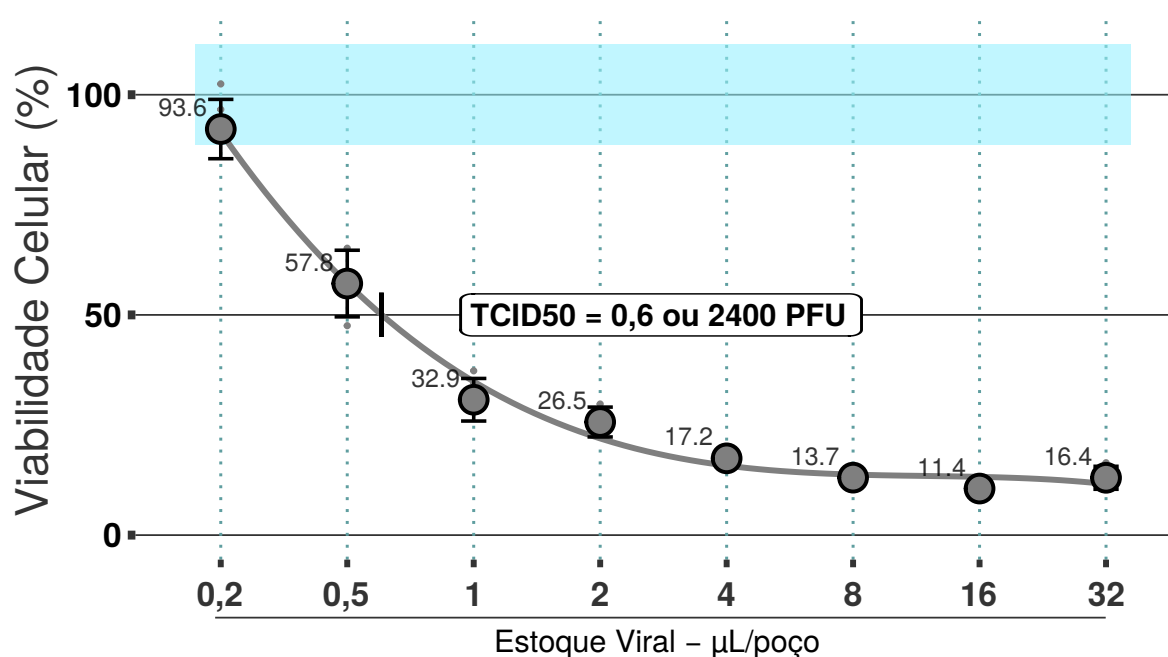


Figura 20 – Determinação da TCID50 do estoque viral. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas por 2 horas com várias concentrações do estoque viral com volume final de $20\mu\text{L/poço}$ (exceto o grupo de $32\mu\text{L}$), o sobrenadante foi substituído por meio de cultivo e as células incubadas por 72 horas. O efeito citotóxico foi mensurado pelo Ensaio de Viabilidade e os valores das absorbâncias convertidos em porcentagem de viabilidade pela Equação (5.1). Os dados do gráfico constam na Tabela 3. Fonte: o autor.

a fusão de células adjacentes, originando grandes estruturas multinucleadas, frequentemente visíveis a olho nu em culturas de células. A formação dessas estruturas (sincícios) é uma das principais características do desenvolvimento da infecção pelo hRSV in vivo e in vitro, sendo inclusive utilizada para a quantificação em amostras clínicas^[119].

Os aspectos morfológicos de sincícios formados em decorrência da infecção por hRSV podem variar em função do tipo celular, condições de plaqueamento, meio de cultivo, temperatura etc. O registro da morfologia desses sincícios é vasto na literatura^[4–6,119]. Geralmente, células HEp-2 formam sincícios grandes e definidos, facilmente identificáveis microscopia de campo claro (Figura 21).

Considerando a característica formação de sincícios do hRSV em células HEp-2, concomitantemente a titulação por TCID50, o aspecto das monocamadas

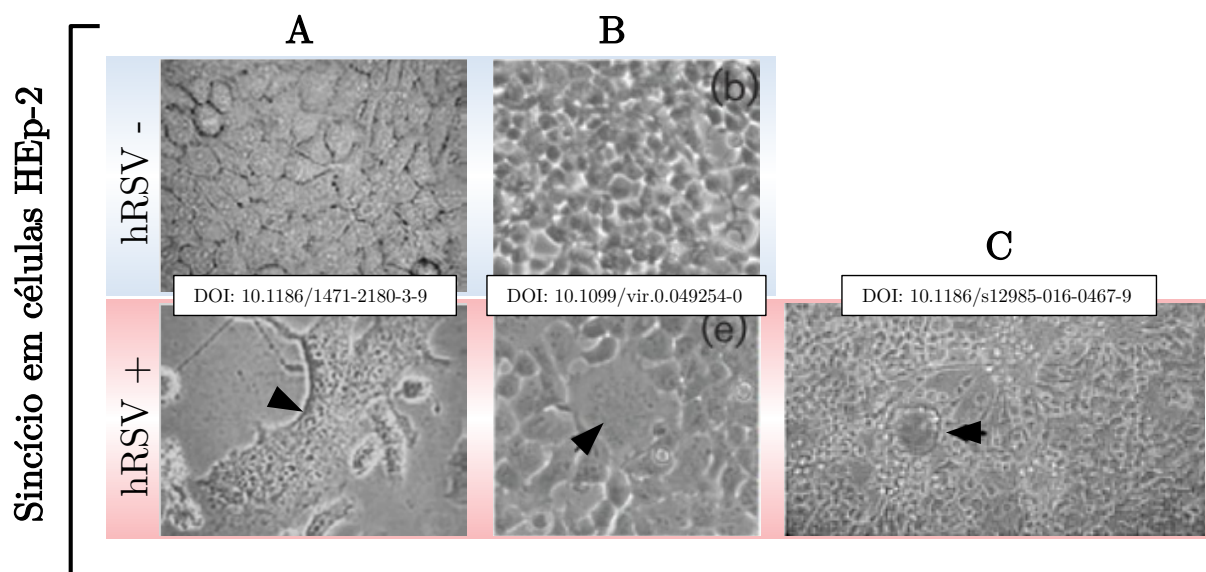


Figura 21 – Aspecto da monocamada de HEp-2 infectada por hRSV. A fusão de células adjacentes é uma das principais características da infecção por hRSV. Monocamadas confluentes de HEp-2 não infectadas, células justapostas e com tamanho semelhante (hRSV -, A e B). Monocamadas infectadas, as setas indicam a presença de sincícios (hRSV +, A–C). Fonte: adaptado de Huong et al.^[4], Bitko et al.^[5] e Tian et al.^[6].

foi monitorado e registrado a cada 24 horas em microscopia de campo claro.

Alterações morfológicas (formação de sincícios) foram observadas ainda nas primeiras 24 horas após a infecção (Figura 22, grupo 32 μL). Após 48 horas, todos os grupos (exceto o controle celular) apresentavam extensa formação de sincícios. Nos grupos de maior concentração (Figura 22, 8–32 μL) foi possível identificar a formação grandes sincícios (20–70 células) espaçados (Figura 22, 48 horas). Nas imagens registradas logo antes da titulação (72 horas pós-infecção), ainda é possível encontrar regiões com a monocamada homogênea nos grupos com menor concentração (Figura 22, 0,5–2 μL). Nos grupos de maior concentração (Figura 22, 4–32 μL) a monocamada é composta basicamente por grandes sincícios espaçados (Figura 22, 72 horas).

As alterações morfológicas registradas 72 horas pós-infecção (Figura 22) corroboram os resultados obtidos na titulação (Figura 20). Grupos com maior viabilidade apresentaram menor número de sincícios, com porções homogêneas da

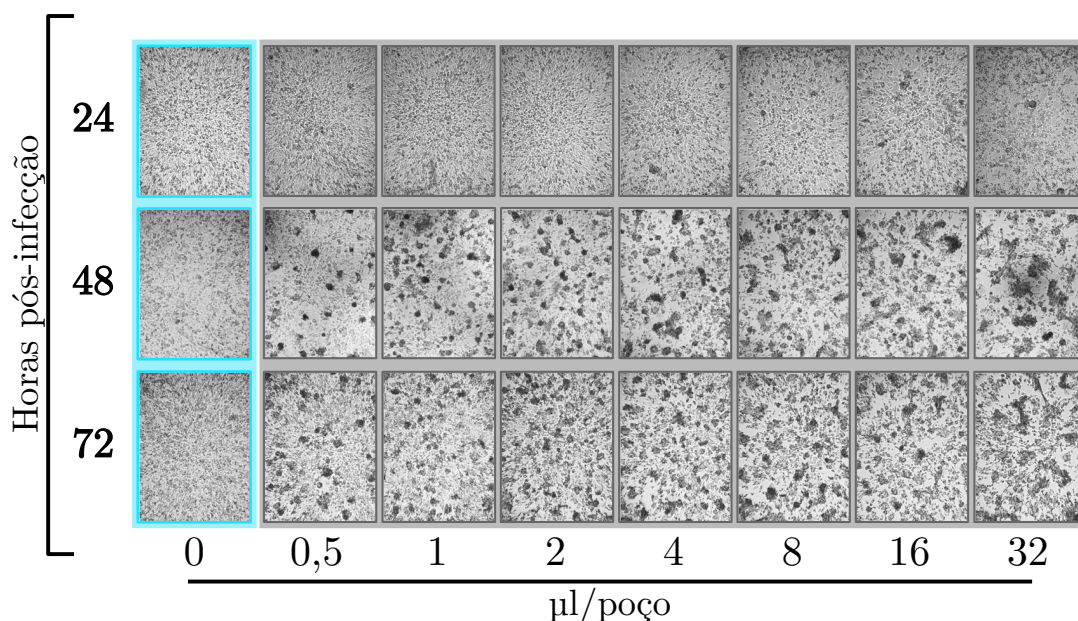


Figura 22 – Aspecto da monocamada de HEP-2 infectadas com hRSV. Células HEP-2 foram infectadas com diferentes concentrações de estoque viral por 2 horas e incubadas por 72 horas. Imagens destacadas em azul correspondem ao grupo controle celular. Microscopia de campo claro, objetiva de 4X. Fonte: o autor.

monocamada (Figura 22, 0,5–1 μL) enquanto os grupos com menor viabilidade apresentam maiores alterações morfológicas, com maior número de sincícios espaçados (Figura 22, 4–32 μL).

A redução dose dependente na viabilidade observada na determinação da TCID₅₀ (Figura 20) e a presença de efeito citopático com extensa formação de sincícios característicos do hRSV (Figuras 22 e 23), harmonizam com as descrições da literatura (Figura 21)^[4-6].

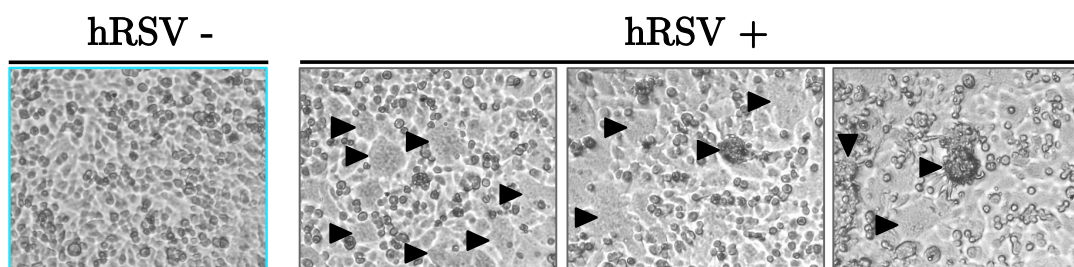


Figura 23 – Detalhe de Sincícios em Células HEP-2. Registro das alterações na estrutura da monocamada (formação de sincícios) induzidas pela propagação hRSV durante a determinação da TCID₅₀ (setas). Microscopia de campo claro, objetiva de 10X. Fonte: o autor.

6.3 Atividade Anti-hRSV

6.3.1 Alterações Morfológicas

Como descrito na literatura e ilustrado na Figura 23, uma das principais características da infecção por hRSV é a formação de estruturas multinucleadas (sincícios) que, na maioria dos casos, aparece escurecida em microscopia de campo claro^[4–6,119]. Durante a execução do protocolo de proteção celular a monocamada era incubada por 72 horas antes de ser submetida ao Ensaio de Viabilidade, porém, inspeções visuais (microscopia de campo claro) eram realizadas em intervalos de 24 horas.

As monocamadas eram monitoradas inicialmente para averiguar se o controle de replicação viral (controle viral) desenvolvia a infecção como o esperado, formando sincícios dentro de até 48 horas (Figura 22) ou se era necessário realizar alguma modificação nos protocolos. Entretanto, o monitoramento de rotina, que a princípio intuía assegurar o andamento do ensaio, evidenciou drástica redução na formação de sincícios em poços tratados com algumas concentrações de proteínas das NET, 48 e 78 horas pós-infecção.

Geralmente quando se quer mostrar as alterações morfológicas em monocamadas, uma ou mais fotos por condição são registradas, entretanto, dependendo da configuração (conjunto de lentes) do microscópio utilizado, cerca de 1% da área da total monocamada pode ser registrada por foto. Ademais, podem ser selecionadas imagens de pontos específicos que mostram ou não determinada alteração morfológica.

Intuindo superar a baixa representatividade de uma única foto por condição e realizar um amplo registro das alterações morfológicas observadas em monocamadas de células HEp-2, aplicou-se um processo normalmente empregado para registrar imagens completas e com alto nível de detalhamento de estruturas enormes como pontes ou montanhas, a técnica de construção de imagens panorâmicas.

Basicamente, fotos sequenciais foram registradas com a menor variação de luminosidade e foco possível, mantendo sempre uma sobreposição mínima de 30–50%. Ajustes de contraste e coloração foram realizados quando necessário, os

pontos de colagem foram detectados pelo algoritmo AutoStitch e as panorâmicas foram montadas utilizando a projeção de Mercator (Figura 24).

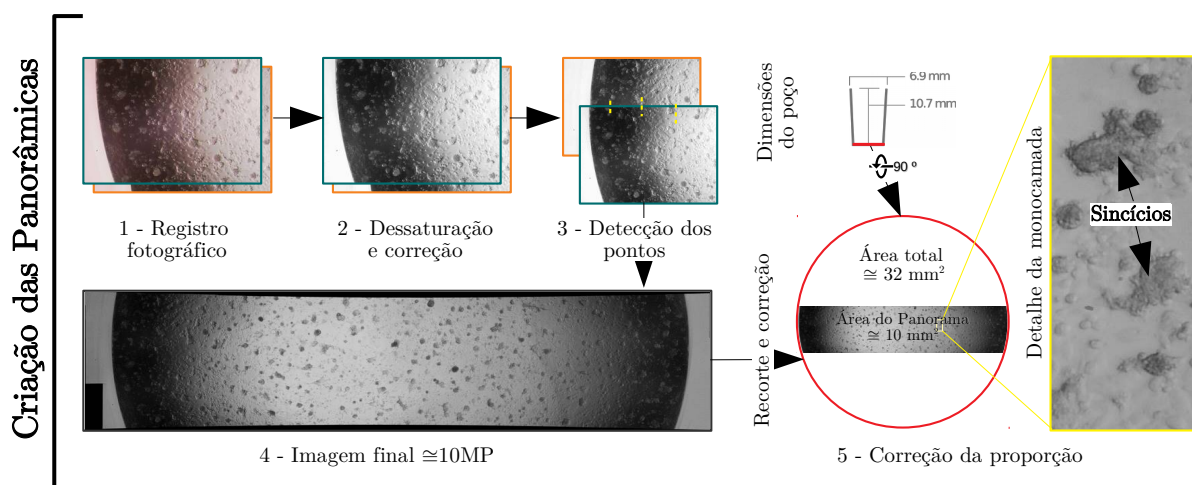


Figura 24 – Esquema de construção das panorâmicas. Dezenas de fotos com sobreposição mínima de 40% foram registradas percorrendo o diâmetro do poço. As imagens foram padronizadas (correção e dessaturação) e a detecção dos pontos de colagem foi feita pelo algoritmo AutoStitch. A imagem final mostra o aspecto da monocamada ao longo do diâmetro do poço, cobrindo cerca de 30% da área total. Fonte: o autor.

Cada panorâmica, composta pela justaposição de 40–50 fotos, revela o aspecto da monocamada ao longo de todo o diâmetro do poço da placa de 96 poços, cobrindo cerca de 30% da área total. Entretanto, manipular várias imagens tão grandes (cerca de 30 MP cada) se mostrou desafio insuperável para computadores comuns. Mesmo em um computador com configuração avançada como o DELL XPS 8930 os travamentos eram constantes, então as panorâmicas originais de 30 MP foram convertidas em panorâmicas com 10 MP, o que possibilitou sua edição e a construção de imagens como a Figura 25.

Neutrófilos utilizam proteases para degradar componentes da matriz extracelular e, em sintonia com os movimentos citoplasmáticos, migrar através dos tecidos seguindo um gradiente quimiotático^[120]. A secreção desse arsenal enzimático é finamente regulada in vivo para minimizar o dano tecidual, entretanto, a exposição direta (proteínas isoladas) dessas proteases sob as células HEP-2 induziu efeito citotóxico relevante (Figura 17 e 19) e, portanto, podem influenciar nas alterações morfológicas induzidas pelo hRSV.

6.3.1.1 Alterações induzidas pelas enzimas das NETs (CC50)

Com intuito de registrar o efeito isolado (sem a presença do hRSV) das enzimas empregadas nesse trabalho (Mieloperoxidase, Proteinase 3, Catepsina G e Elastase) sob as células HEp-2, durante o ensaio de Determinação da Citotoxicidade, o aspecto morfológico da monocamada foi registrado via técnica de imagem panorâmica (Figura 24). Os resultados obtidos foram convenientemente sumarizados, as panorâmicas dos grupos que apresentaram pouca ou nenhuma alteração morfológica foram recortadas e, nos grupos de maior concentração de cada enzima, as panorâmicas completas foram mantidas.

Nas condições testadas, a Mieloperoxidase (dados não mostrados) e a Proteinase 3 (Figura 25, destacado em azul) não apresentaram alteração visualmente perceptível na homogeneidade da monocamada, o aspecto dos grupos teste era idêntico ao do grupo controle celular. Diferentemente, a Catepsina G e Elastase induziram evidente alteração na estrutura da monocamada, principalmente nas maiores concentrações testadas, as células perderam a contiguidade e se aglomeraram, expondo o fundo do poço da placa de cultura (Figura 25, Catepsina G 16 $\mu\text{mol/mL}$ e Elastase 32 $\mu\text{mol/mL}$).

O resultado do ensaio visual corrobora parcialmente com o observado no ensaio de Determinação da Citotoxicidade. A Mieloperoxidase e Proteinase 3, que não foram capazes de reduzir a viabilidade celular em pelo menos 50% (Figuras 17 e 19), também não apresentaram alterações morfológicas perceptíveis na monocamada em todas as condições testadas (Figura 25).

As alterações morfológicas observadas nas maiores concentrações de Catepsina G e Elastase, também harmonizam com os dados do ensaio de Determinação da Citotoxicidade, que registraram significativa redução na viabilidade celular nos grupos tratados com as maiores concentração de enzimas (Figuras 17, 16 $\mu\text{mol/mL}$ e 19, 32 $\mu\text{mol/mL}$). A perda da contiguidade da monocamada e a redução na viabilidade celular observada nessas condições, restringem a propagação célula a célula do hRSV, prejudicando a replicação e a formação de sincícios, portanto, os dados dos ensaios visuais que serão apresentados nas seções seguintes, devem ser analisados com ressalvas quando nessas faixas de concentração (8–16 $\mu\text{mol/mL}$, Catepsina G e 16–32 $\mu\text{mol/mL}$ Elastase).

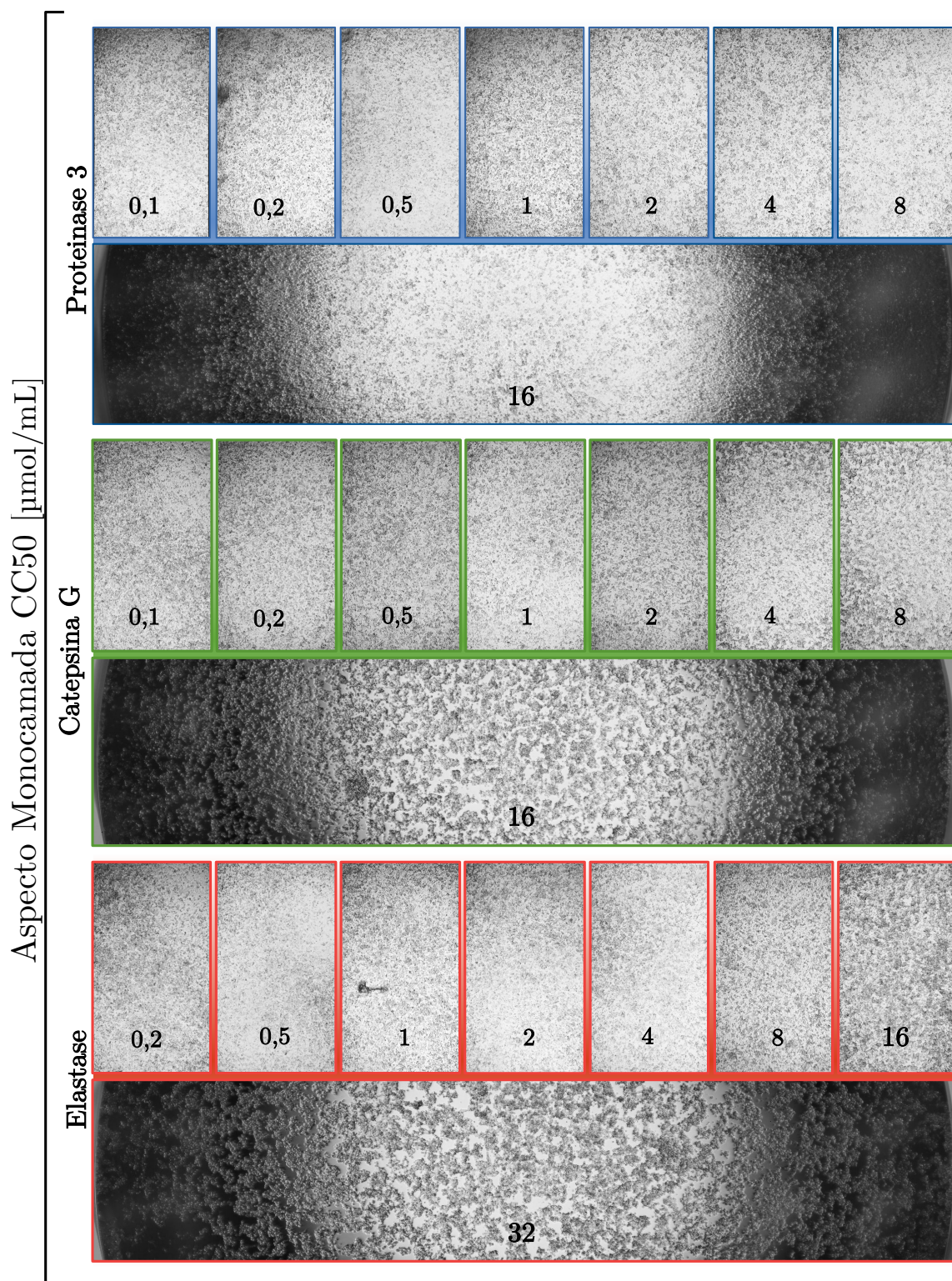


Figura 25 – Aspecto da monocamada no ensaio de CC50. Células HEp-2 foram incubadas por 2 horas com diferentes concentrações de Proteínase 3 (azul), Catepsina G (verde) e Elastase (vermelho). Após 72 horas, o aspecto foi registrado utilizando a técnica de imagem panorâmica. Fonte: o autor.

6.3.1.2 Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase

A Mieloperoxidase, diferentemente das demais enzimas testadas nesse trabalho, é uma peroxidase capaz de catalizar a produção de intermediários altamente reativos como o ozônio (O_3) e o oxigênio singlete (1O_2)^[104,105]. Mesmo com o potencial de gerar compostos muito tóxicos, a Mieloperoxidase não exerceu citotoxicidade relevante ($\geq 50\%$) em nenhuma das concentrações testadas (Figura 13), além de não apresentar nenhuma alteração morfológica na monocamada durante o ensaio visual (dados não mostrados).

Para avaliar o efeito da Mieloperoxidase nas alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV (Figuras 21 e 22), durante o ensaio de Proteção Celular (seção 5.7.2), após o período de incubação de 72 horas, o aspecto das monocamadas foi registrado via técnica de imagem panorâmica como descrito na Figura 24.

A pré-incubação do hRSV com Mieloperoxidase por 2 horas não comprometeu a virulência do inóculo, as alterações morfológicas oriundas da replicação do hRSV permaneceram intactas independente da concentração de Mieloperoxidase (Figura 26, 0,2–32 $\mu\text{mol/mL}$). O aspecto morfológico dos grupos teste (em que houve pré-incubação com Mieloperoxidase) é aparentemente idêntico ao aspecto do grupo controle viral, apresentando numerosos sincícios distribuídos por toda a monocamada.

Em nenhuma das condições testadas a Mieloperoxidase induziu desafixação ou aglomeração celular como observado nas maiores concentrações de Catepsina G e Proteínase 3 (Figura 25), fato esse coerente com a natureza catalítica da Mieloperoxidase.

Cabe destacar que, embora a Mieloperoxidase não tenha apresentado relevante citotoxicidade, não tenha induzido alteração morfológica nas monocamadas e que também não tenha reduzido a formação de sincícios, nas maiores concentrações testadas, houve redução no contraste nas imagens registradas, ou seja, menor diferença entre o tom da monocamada contígua (tons mais claros) e o tom dos sincícios (tons mais escuros), dificultando a análise visual (Figura 26, 16–32 $\mu\text{mol/mL}$).

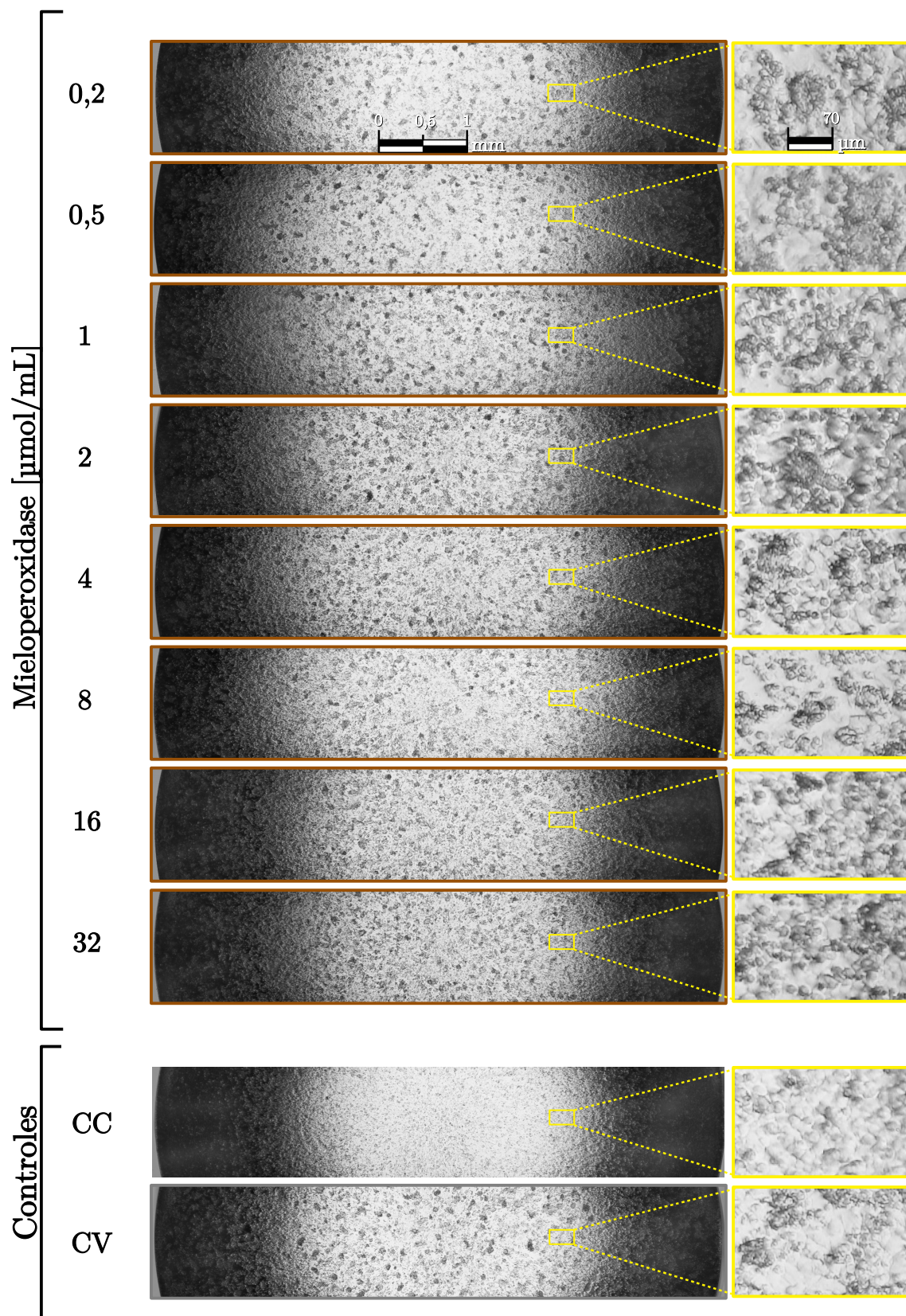


Figura 26 – Aspecto da monocamada Mieloperoxidase. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. A pré-incubação do hRSV com Mieloperoxidase por 2 horas não foi capaz de reduzir visualmente a formação de sincícios em nenhuma das concentrações testadas. Fonte: o autor.

6.3.1.3 Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Proteinase 3

A Proteinase 3, diferentemente da Mieloperoxidase, é uma serina endopeptidase expressa constitutivamente na membrana citoplasmática dos neutrófilos humanos. Dentre as serino proteases utilizadas nesse trabalho, a Proteinase 3 é a única capaz de regular de funções de proliferação celular e apoptose via clivagem direta de substratos intracelulares^[121, 122].

O efeito da Proteinase 3 nas alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV (principalmente a formação de sincícios) foi registrado com auxílio de uma câmera acoplada em microscópio invertido via técnica de imagem panorâmicas durante o ensaio de Proteção Celular.

A pré-incubação do hRSV com Proteinase 3 por 2 horas reduziu visivelmente as alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV. Nas concentrações de 4–16 $\mu\text{mol/mL}$ constatou-se relevante redução no número de sincícios quando comparado com o grupo controle viral (Figura 27). Concomitantemente, nota-se tendência de redução no tamanho dos sincícios, principalmente na faixa 1–16 $\mu\text{mol/mL}$.

Observando o aspecto geral da monocamada (ao longo de todo o diâmetro do poço) é possível notar que, além da redução na formação de sincícios, quanto maior a concentração de Proteinase 3, maior a incidência de áreas com monocamada preservada (células contíguas). Essa ausência de desafixação celular, mesmo nas maiores concentrações testadas (8–16 $\mu\text{mol/mL}$), corrobora o resultado do ensaio realizado somente com a Proteinase 3 (Figura 25, destacado em azul) e, possivelmente, contribui para a baixa citotoxicidade demonstrada no ensaio de CC50 (Figura 15).

Os destaques em amarelo evidenciam detalhes de áreas que foram delimitadas somente pela montagem da figura, ou seja, não foram selecionadas de acordo com alguma característica específica e, exemplificam a dificuldade de observar as alterações morfológicas de monocamadas via representação limitada (foto única). Considerando somente os destaques, não é possível notar relevante diferença entre os grupos 2 e 16 $\mu\text{mol/mL}$, porém, ao analisar toda a panorâmica, observa-se evidente redução na formação dos sincícios concomitante a preservação da estrutura normal da monocamada (Figura 27).

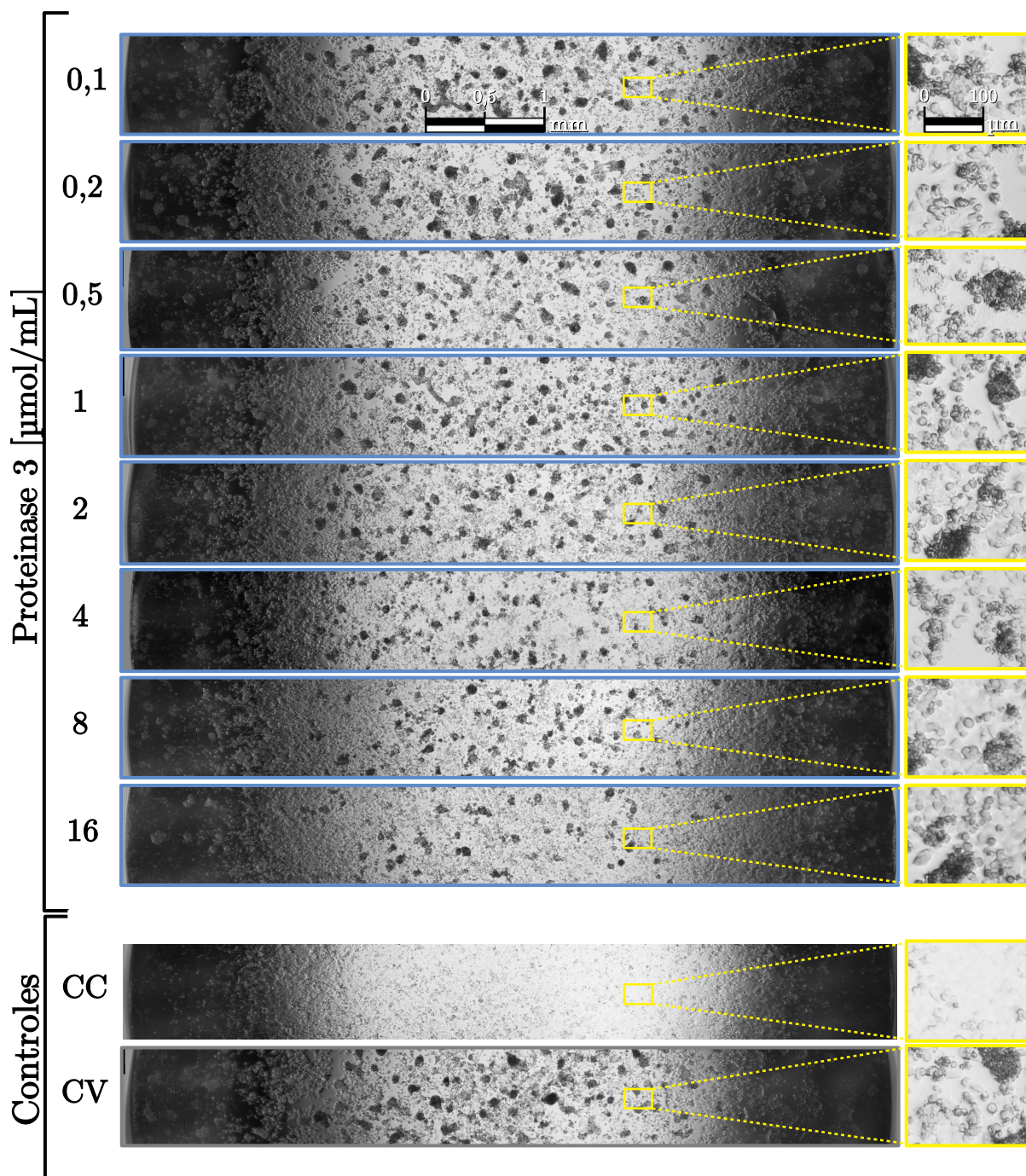


Figura 27 – Aspecto da monocamada Proteinase 3. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. O aspecto da monocamada foi registrado como o descrito na Figura 24. A pré-incubação do hRSV com Proteinase 3 por 2 horas reduziu visualmente a formação de sincícios nas maiores concentrações testadas. Fonte: o autor.

6.3.1.4 Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Catepsina G

Dentre as serino proteases avaliadas nesse trabalho, a Catepsina G é a que apresenta maior afinidade ao DNA devido ao seu elevado ponto isoelétrico (≈ 12). Auxilia a migração leucocitária através dos tecidos e exerce diversas funções imunológicas, regulando a inflamação pela modificação estrutural de citocinas e quimiocinas, interagindo com receptores celulares e promovendo a ativação de elementos do sistema complemento^[111, 123].

O efeito da Catepsina G nas alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV (principalmente a formação de sincícios) foi registrado via técnica de imagem panorâmicas durante o ensaio de Proteção Celular 72 horas pós-infecção.

A pré-incubação do hRSV com Catepsina G por 2 horas reduziu visivelmente as alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV. Nas concentrações de 2–16 $\mu\text{mol/mL}$ constatou-se drástica redução no número e no tamanho dos sincícios (Figura 28). Analisando o aspecto geral da monocamada é possível notar que em algumas concentrações a Catepsina G, assim como a Proteinase 3, além de reduzir a formação dos sincícios, preservou a maior parte da monocamada (Figura 28, 1–4 $\mu\text{mol/mL}$).

As maiores concentrações de Catepsina G praticamente impediram a formação de sincícios, entretanto, nessas condições a desafixação e aglomeração celular descritas anteriormente (Figura 25, destacado em verde) são aqui reiteradas, principalmente na porção periférica da monocamada (Figura 28, 8–16 $\mu\text{mol/mL}$). Quando avaliados somente pelas áreas destacadas em amarelo (foto única), alguns conglomerados celulares formam estruturas que se assemelham aos sincícios oriundos da replicação do hRSV (Figura 28 16 $\mu\text{mol/mL}$, destacado em amarelo), porém, ao analisar o aspecto morfológico da monocamada como um todo, é possível distinguir facilmente o padrão de formação dos sincícios com o padrão da formação dos conglomerados celulares (Figura 28, CV, destacado em amarelo). Nestas situações, a técnica de construção de imagens panorâmicas são especialmente úteis, uma vez que permitem ao observador avaliar uma área significativamente maior da monocamada e registrar grandes sincícios como o observado no controle viral (Figura 28, CV).

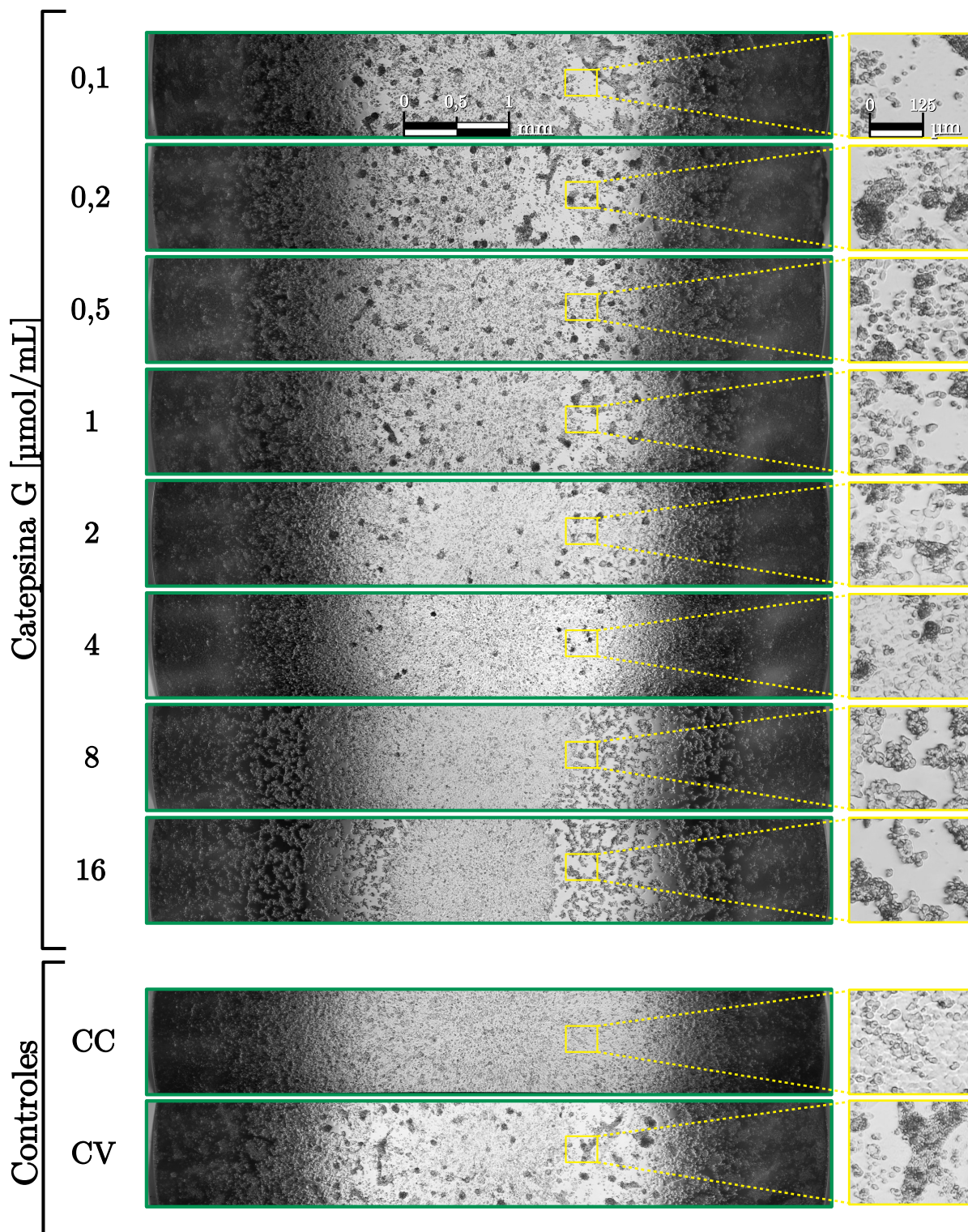


Figura 28 – Aspecto da monocamada Catepsina G. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. O aspecto da monocamada foi registrado como o descrito na Figura 24. A pré-incubação do hRSV com Catepsina G por 2 horas reduziu drasticamente a formação de sincícios nas concentrações de 2–4 $\mu\text{mol/mL}$. Fonte: o autor.

6.3.1.5 Alterações induzidas por hRSV pré-incubado em Elastase

A Elastase é a serino protease com maior número de funções descritas na literatura, degrada partículas ingeridas por fagocitose, hidrolisa colágeno e ativa colagenases, interage com receptores celulares, inibe a ativação neutrofílica via elementos do sistema complemento, ativa linfócitos e promove agregação plaquetária^[124, 125].

O efeito da Elastase nas alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV (principalmente a formação de sincícios) foi registrado com auxílio de um microscópio invertido via técnica de imagem panorâmicas durante o ensaio de Proteção Celular 72 horas pós-infecção.

A pré-incubação do hRSV com Elastase por 2 horas reduziu visivelmente as alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV. Nas concentrações de 4–16 $\mu\text{mol/mL}$ constatou-se drástica redução no número sincícios (Figura 28), entretanto, sem redução perceptível no tamanho dos sincícios como o descrito nas demais endoproteases (Figuras 27 e 28).

A monocamada apresentou intensa desafixação com conseguinte aglomeração celular na concentração de 32 $\mu\text{mol/mL}$, como já descrito anteriormente, essas alterações na estrutura da monocamada inviabilizam o monitoramento da formação dos sincícios (Figura 25, destacado em vermelho). Além disso, o ensaio de citotoxicidade evidenciou comprometimento na viabilidade da monocamada nessa faixa de concentração (Figura 19, 16–32 $\mu\text{mol/mL}$).

Observando o aspecto geral da monocamada é possível notar que a Elastase, assim como a Proteinase 3 e Catepsina G, além de reduzir a formação dos sincícios, preservou a maior parte da monocamada em algumas concentrações (Figura 29, 4–16 $\mu\text{mol/mL}$). A redução na formação dos sincícios observada nesse ensaio foi a mais abrupta dentre todos, variando de efeito nenhum para efeito evidente em concentrações consecutivas (Figura 29, 2–4 $\mu\text{mol/mL}$), além disso, houve bloqueio da formação de sincícios com manutenção da estrutura da monocamada em duas concentrações (Figura 29, 8–16 $\mu\text{mol/mL}$). A ausência da formação de sincícios concomitante a manutenção do aspecto normal da monocamada (idêntico ao grupo controle celular) é um relevante indício de um potente efeito virucida da Elastase *in vitro*.

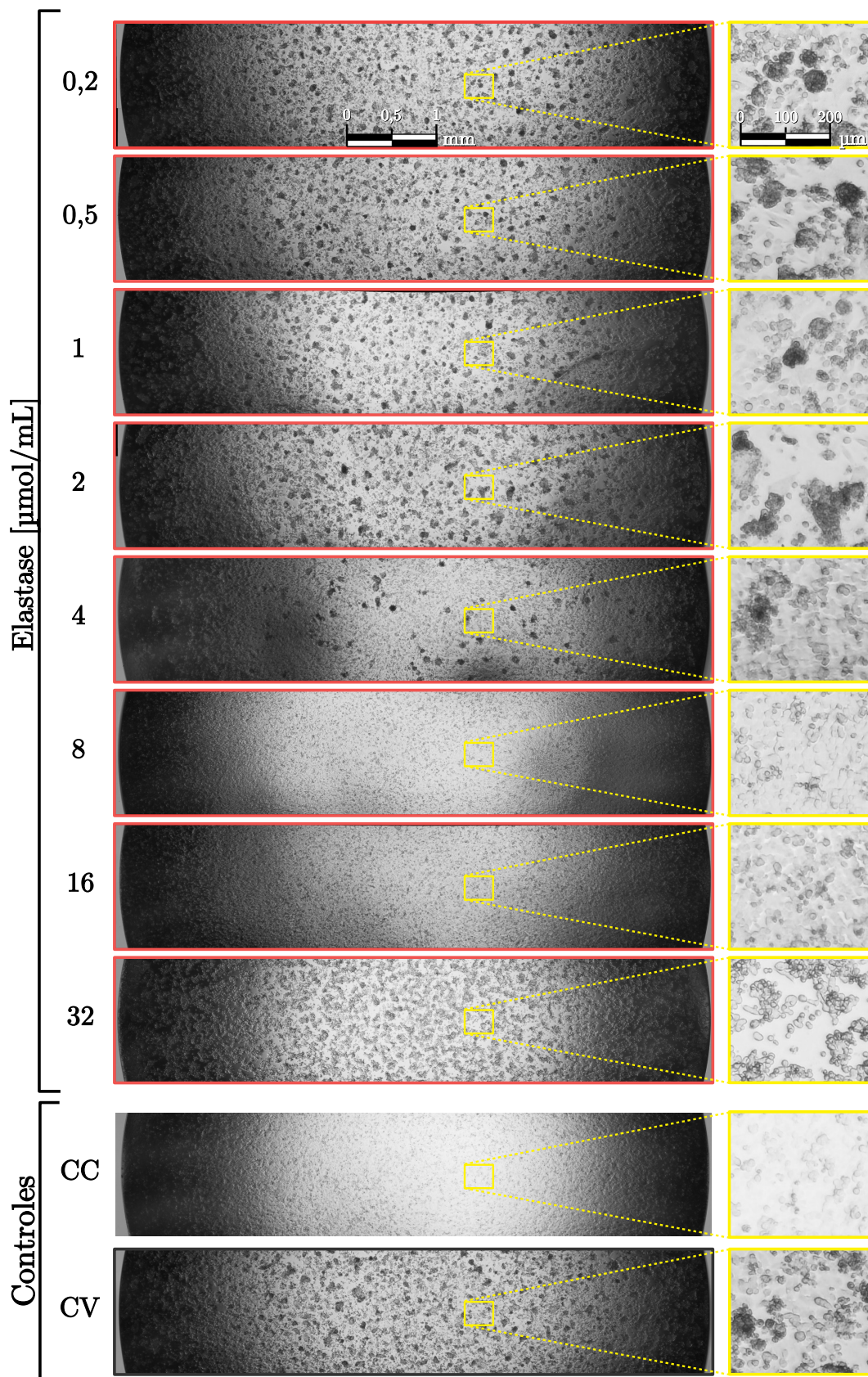


Figura 29 – Aspecto da monocamada Elastase. Células HEp-2 foram tratadas de acordo com o ensaio de Proteção Celular até a etapa de incubação de 72 horas. A pré-incubação do hRSV com Elastase por 2 horas reduziu drasticamente a formação de sincícios em várias concentrações testadas. Fonte: o autor.

6.3.2 Quantificação Sincicial

A análise digital de imagem é um campo da Ciência da Computação que, impulsionado pelos avanços de hardware e software (principalmente os livres), tem se tornado cada vez mais presente em nosso cotidiano, seja para conferir uma multa automática de trânsito ou registrar a foto de um buraco negro ^[126].

Como demonstrado na seção anterior (6.3.1) a pré-incubação do hRSV em proteínas provenientes das NETs reduziram visivelmente a formação de sincícios e, em algumas condições, preservaram a estrutura da monocamada de células HEp-2 (Figuras 27-29). Intuindo evidenciar o resultado do ensaio de alterações morfológicas, as imagens panorâmicas passaram por um processo de quantificação digital de imagem.

O termo “extração de informações quantitativas a partir de imagens” nos remete inicialmente a algo relacionado com um filme de *Sci-Fi*, entretanto, tomar decisões baseadas em imagens é algo corriqueiro para os seres vivos que possuem olhos, nós humanos fazemos isso enquanto caminhamos ou quando rejeitamos uma vaga de estacionamento que julgamos ser pequena demais. Reconhecer um objeto e estipular seu tamanho é algo que nosso cérebro faz naturalmente, o que não significa ser simples reproduzir computacionalmente essa capacidade.

“If you try and take a cat apart to see how it works, the first thing you have on your hands is a nonworking cat.”, (DOUGLAS ADAMS, The Salmon of Doubt, 2002).

Mesmo ainda distante do ideal, a ciência da quantificação por imagem tem avançado muito, existem diversas metodologias robustas para se analisar/quantificar uma imagem ^[127]. Independentemente do método empregado, se faz necessário estabelecer quais são as características que permitem diferenciar o que deve ser considerado (objetos) e o que não deve (*background* ou fundo). No caso das imagens panorâmicas, como demonstrado no ensaio de Alterações Morfológicas, as estruturas mais escuras correspondem aos sincícios (objetos) e o restante mais claro e a monocamada homogênea ou, em caso de desafixação celular, o fundo do poço (*background*).

Uma imagem digital é basicamente uma matriz onde cada valor representa um píxel. As panorâmicas são imagens em tons de cinza com 8 bits de

profundidade, ou seja, seus pixels contém apenas informação referente a intensidade luminosa (total de 2^8 níveis). Nesse caso, o método de pré-processamento mais simples e eficaz de separar os objetos do *background* é a segmentação por *Thresholding*.

Ao ser processada por um *Thresholding* a imagem sofre redução dos níveis (cores), nesse trabalho, o intuito é quantificar apenas o que é e o que não é sincício (duas categorias), portanto empregou-se o *Thresholding* para reduzir os níveis da imagem de 256 (tons de cinza) para apenas 2 (imagem preto e branco ou binária). Neste caso, o nível de padronização das imagens influencia diretamente o resultado da quantificação, então as panorâmicas resultante de cada ensaio foram convertidas em uma imagem única e, essa imagem única, foi processada de acordo com a Figura 30.

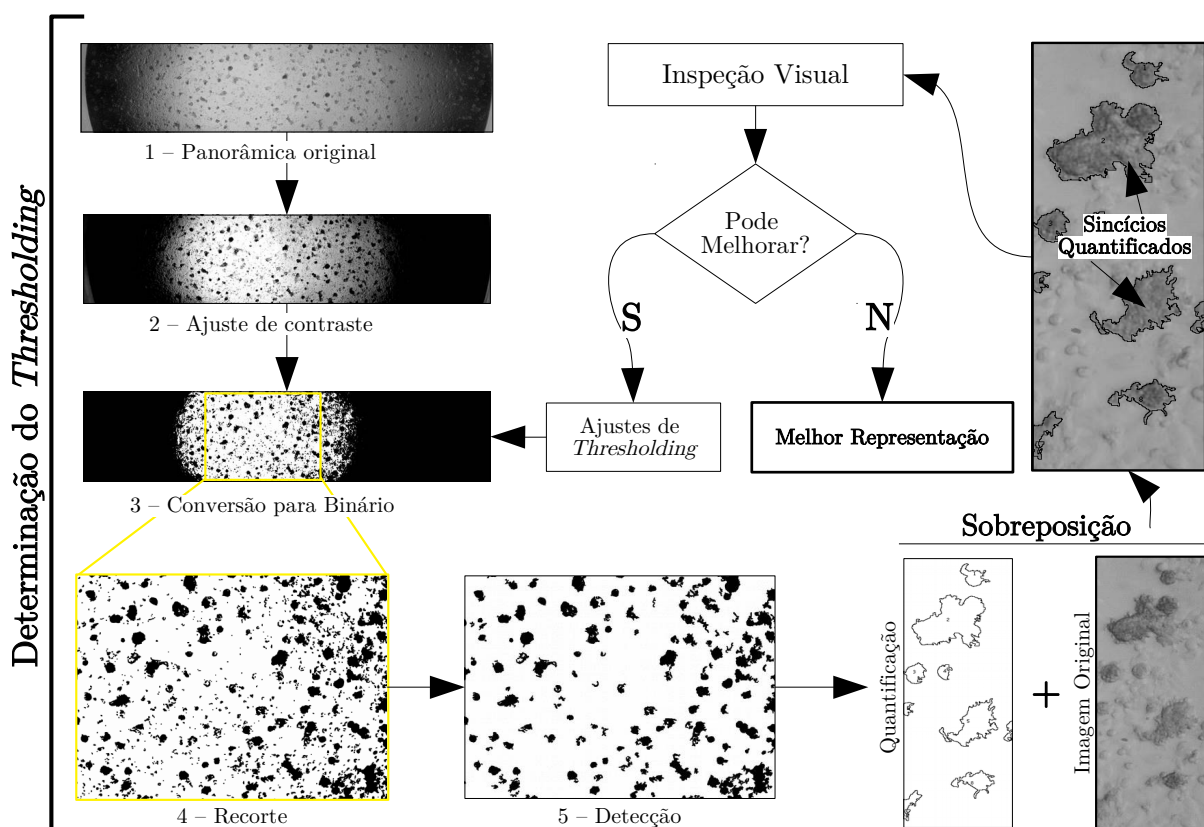


Figura 30 – Processo de determinação do *Thresholding*. O controle viral foi utilizado para calibrar, via inspeção visual da sobreposição, o nível de *Thresholding* que melhor representasse os sincícios da monocamada. O *Thresholding* foi realizado com auxílio do IMAGEJ e a sobreposição da quantificação com a panorâmica original foi realizada no GIMP. Fonte: o autor.

Todas as etapas de pré-processamento foram realizadas intuindo evidenciar ao máximo os sincícios do grupo controle viral, entretanto, em todas panorâmicas a região periférica do poço apresentou menos brilho do que a região central, essa discrepância se intensificou durante o ajuste de contraste e, após o *Thresholding*, a região periférica do poço escureceu totalmente (Figura 30, 2 e 3). Então, as laterais da imagem foram removidas e o terço médio, mantendo a mesma área para todas panorâmicas, foi selecionado (Figura 30, 4). A imagem dos objetos quantificados foi sobreposta a panorâmica original para delimitar o que foi considerado sincício e o que foi considerado *background* (Figura 30, Sobreposição).

O processo detalhado de extração de dados quantitativos das panorâmicas está ilustrado na Figura 31. A detecção foi realizada com auxílio do software IMAGEJ via ferramenta *Analyze Particles*. Essa ferramenta utiliza pelo menos dois parâmetros para identificar os objetos de uma imagem: o *cutoff*, que é o intervalo de valores (em pixels) que representam os objetos a serem considerados e o índice *Circularity* que avalia a circularidade de objeto (sendo valores próximos de 0 para objetos com baixa circularidade e 1,0 para objetos com circularidade perfeita).

O *cutoff* utilizado na quantificação das imagens panorâmicas não foi exatamente o mesmo, pois o tamanho dos sincícios variou de acordo com o ensaio. No geral, o intervalo de *cutoff* utilizado na Quantificação Sincicial foi de $100-\infty$, então, foram consideradas na quantificação todos os objetos com área ≥ 100 pixels.

A restrição baseada no formato não apresentou grande utilidade na quantificação das panorâmicas, a maior parte dos sincícios possuíam formato complexo, com projeções e reentrâncias, nesse caso, foi mantido o valor de intervalo padrão do *Circularity* em todas as quantificações (0,0–1,0), ou seja, foram considerados objetos com qualquer forma.

Com os parâmetros *cutoff* e *Circularity* definidos, a ferramenta *Analyze Particles* é capaz de calcular dezenas de descritores de forma e tamanho dos objetos. No ensaio de Quantificação Sincicial foram utilizados apenas o número total de sincícios, sua posição e tamanho. Os dados foram exportados, sumarizados e organizados em tabelas, o número total de sincícios foi utilizados diretamente

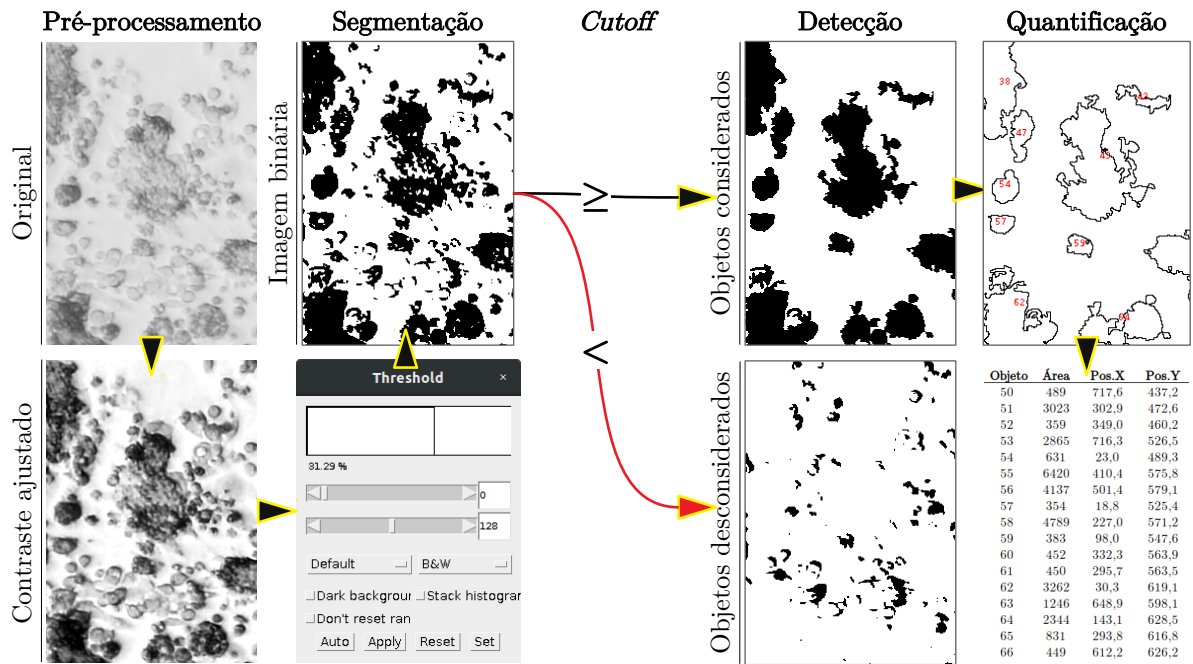


Figura 31 – Processo detalhado da quantificação dos sincícios. Etapas empregadas na conversão das imagens panorâmicas (dados qualitativos) em tabelas com o número e tamanho dos sincícios (dados quantitativos). Os ajustes de contraste e *Thresholding* foram realizados manualmente com auxílio dos softwares GIMP e IMAGEJ. Fonte: o autor.

nos gráficos, os demais descritores foram convertidos em índices conforme as Equações 6.1 e 6.2.

$$Tamanho\ Relativo\ (\%) = \left(\frac{T}{V}\right) * 100 \tag{6.1}$$

$$Área\ Relativa\ (\%) = \left(\frac{\sum S}{A}\right) * 100 \tag{6.2}$$

Sendo:

- T* Média aritmética das áreas dos sincícios do grupo teste
- V* Média aritmética das áreas dos sincícios controle viral
- S* Área dos sincícios (pixels pretos)
- A* Área total (pixels brancos + pretos)

6.3.2.1 Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase

A quantificação das panorâmicas do ensaio de Alterações Morfológicas da Mieloperoxidase foi o mais difícil de ser parametrizado, pois, como descrito na seção 6.3.2, a premissa fundamental da quantificação por *Thresholding* é que haja relevante diferença na intensidade entre os pixels dos objetos e do *background*. Foram registradas panorâmicas em 5 ocasiões, duas após 48 e três após 72 horas de incubação e, em todas elas, o contraste das imagens aparentava reduzido quando comparado aos ensaios realizados com demais proteínas.

“I’m gonna try / Try, try, try, oh...try / Try it over, and over, and over, over again”, (TIM MAIA, 1973).

O valor de *Thresholding* e *Cutoff* foram determinados tendo como critério a melhor representação dos sincícios (baseado na sobreposição) do grupo controle viral e foram utilizados em todos os demais grupos.

A formação dos sincícios oriundos da replicação do hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase não apresentou aparente redução no ensaio de Alterações Morfológicas (seção 6.3.1.2), entretanto, a quantificação dessas panorâmicas apontaram uma pequena redução no número de sincícios em algumas concentrações (32, Núm. Sincícios, 8–32 $\mu\text{mol/mL}$).

Dois grupos tratados com Mieloperoxidase apresentaram mais sincícios do que o controle viral (Figura 32, Núm. Sincícios, 0,2 e 4 $\mu\text{mol/mL}$), entretanto, somente o número total de sincícios não deve ser usado para determinar se houve efeito na replicação viral. Ao registrar o desenvolvimento da infecção do hRSV em monocamadas de HEP-2, ficou claro que, dependendo da intensidade da infecção, sincícios adjacentes podem se fundir e o número total de sincícios tende a diminuir e seu tamanho médio aumentar.

O tamanho médio dos sincícios dos grupos que foram tratados com Mieloperoxidase é de 98%, ou seja, praticamente idêntico ao tamanho médio do controle viral (100%), apenas 1 grupo apresentou tamanho médio maior do que 105% (Figura 32, Tamanho, 8 $\mu\text{mol/mL}$).

Além do número total e tamanho médio dos sincícios, foi calculado outro índice baseado no número total de pixels dos objetos (sincícios) dividido pelo

número total de pixels da seleção. A Área Relativa dos grupos tratados com as maiores concentrações de Mieloperoxidase foram as menores registradas, com média de 6,6% do total (Figura 32, 16 e 32 $\mu\text{mol/mL}$).

O conjunto dos dados quantitativos indicam pouca redução na formação dos sincícios mesmo nas maiores concentrações testadas (Figura 32, 16 e 32 $\mu\text{mol/mL}$).

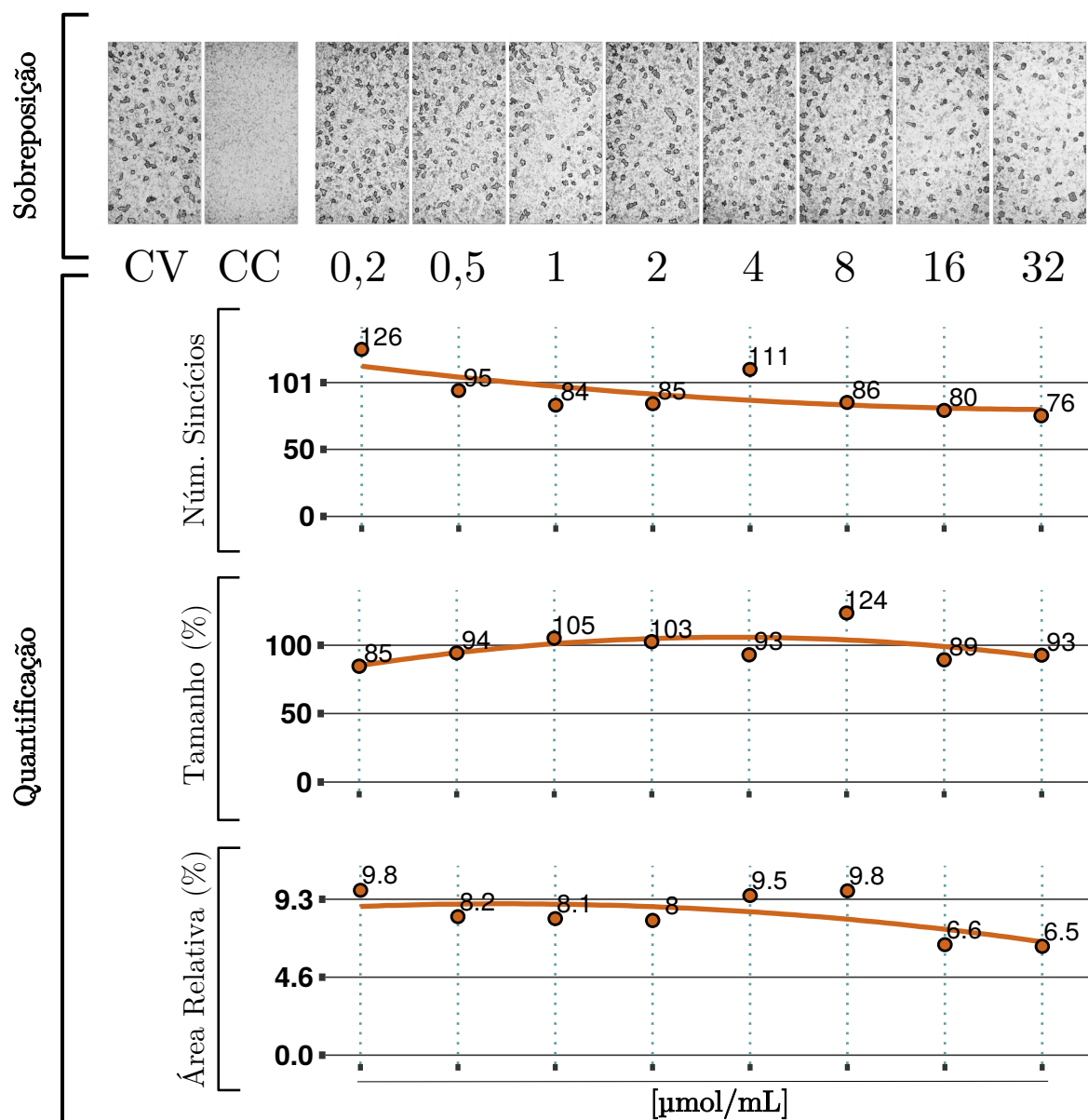


Figura 32 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Mieloperoxidase. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito na seção 6.3.2, os dados constam na Tabela 16. Fonte: o autor.

6.3.2.2 Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Proteinase 3

A quantificação das panorâmicas do ensaio de Alterações Morfológicas da Proteinase 3 foi realizada como o descrito em na seção 6.3.2, os valores de *Thresholding* e *Cutoff* foram estabelecido com base no controle viral e utilizados nos demais grupos. Foram necessárias registrar panorâmicas em apenas 2 ocasiões, pequenos ajustes no procedimento contribuíram para obter imagens com maior contraste, o que simplificou o processo de ajuste do *Thresholding* e possibilitou uma excelente representação dos sincícios.

“By three methods we may learn wisdom: First, by reflection, which is noblest; Second, by imitation, which is easiest; and third by experience, which is the bitterest”, (CONFUCIUS).

A Proteinase 3 reduziu visualmente a formação dos sincícios do hRSV (Figura 27, 4–16 $\mu\text{mol/mL}$), entretanto, a quantificação registrou média de 58 sincícios no grupo pré-incubado em Proteínase 3 contra 43 do grupo controle viral, aumento de cerca de 35% (Figura 35, Núm. Sincícios). Apenas 1 grupo apresentou redução no número de sincícios (Figura 35, Núm. Sincícios, 16 $\mu\text{mol/mL}$). Embora o número total de sincícios tenha aumentado, houve considerável redução do tamanho médio (cerca de 50%), grupos com os maiores sincícios correspondem as menores concentrações de Proteínase 3 e, dentro da faixa 0,5–16 $\mu\text{mol/mL}$ (maiores concentrações), apenas um grupo registrou tamanho médio maior do que 50% (Figura 35, Tamanho, 2 $\mu\text{mol/mL}$).

Em relação a área total ocupada por sincícios, os maiores valores também compreendem os grupos com as menores concentrações de Proteinase 3, com média de 29% na faixa de 0,1–1 $\mu\text{mol/mL}$. Na faixa com as maiores concentrações, o valor médio da Área Relativa foi de 19%, aproximadamente metade dos 37% apresentado pelo controle viral (Figura 35, Área Relativa, 2–16 $\mu\text{mol/mL}$).

Os dados quantitativos da Proteínase 3 ilustram o fenômeno descrito na seção 6.3.2.1, sincícios adjacentes do grupo controle viral provavelmente cresceram até se fundir (Figura 35, Sobreposição, CV), ocasionando redução em número com conseqüente aumento do tamanho médio.

A redução da formação sincicial descrita no ensaio de Alterações Morfológicas, foi confirmada pela quantificação, com redução do tamanho médio e da

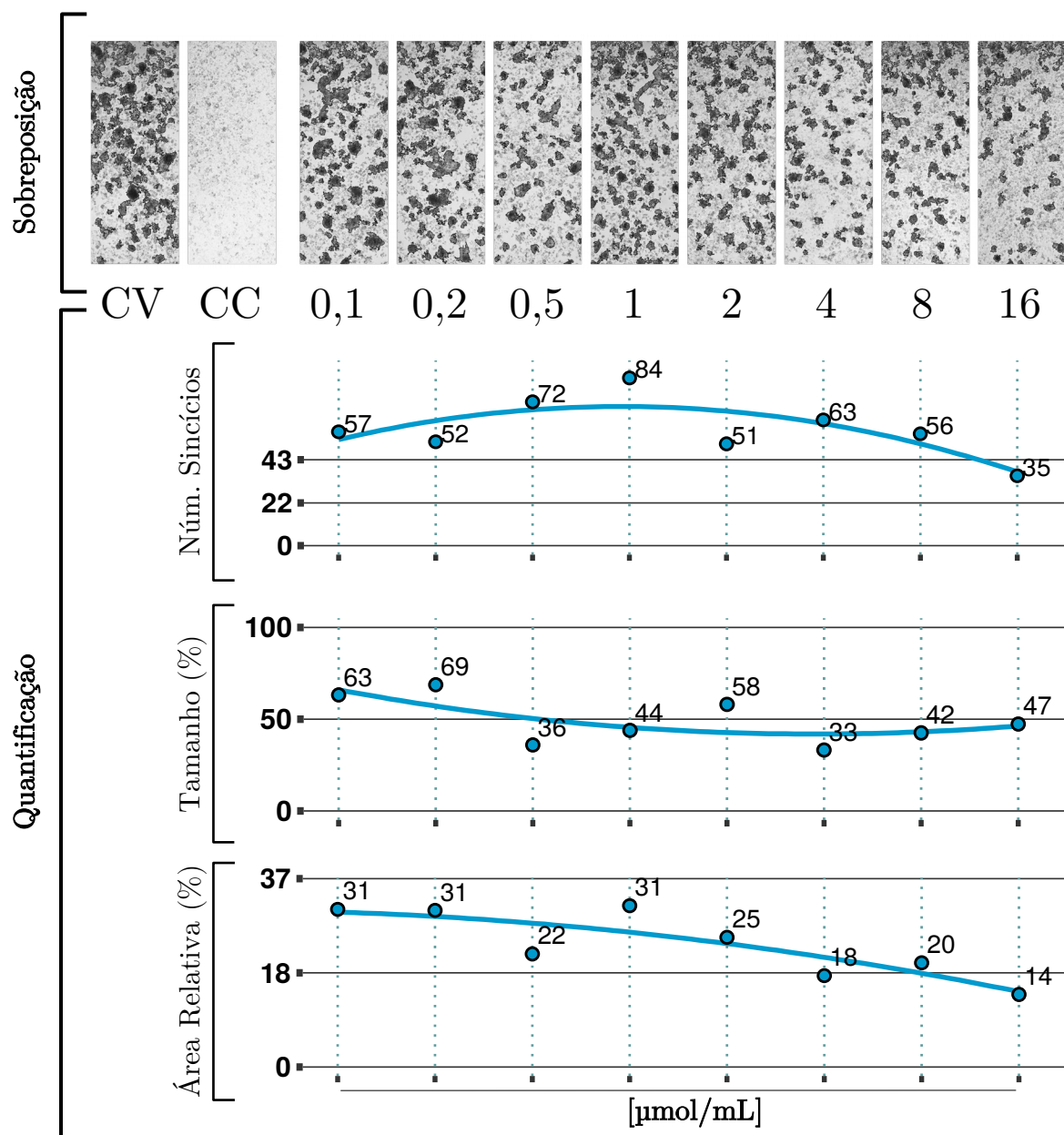


Figura 33 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Proteínase 3. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito em 6.3.2, os dados dos gráficos constam na Tabela 17. Fonte: o autor.

Área Relativa ocupada por sincícios na faixa de 4–16 $\mu\text{mol/mL}$. Cabe destacar que a Proteínase 3 não induziu desafixação celular, mantendo o aspecto normal da monocamada (Figura 27) e, portanto, na maior concentração testada, a pré-incubação do hRSV em Proteínase 3 preservou mais de 80% da monocamada (Figura 35, 16 $\mu\text{mol/mL}$).

6.3.2.3 Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Catepsina G

A quantificação das panorâmicas do ensaio de Alterações Morfológicas da Catepsina G seguiu os moldes dos ensaios anteriores (seção 6.3.2), todos os ajustes foram realizados intuindo obter a melhor sobreposição no grupo controle viral. Regiões marcadas em vermelho foram desconsideradas da quantificação devido a desafixação celular descrita anteriormente (Figura 34, Sobreposição, 8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$).

*“If you define the problem correctly, you almost have the solution”,
(STEVE JOBS).*

A quantificação confirmou a redução na formação sincicial observada anteriormente (Figura 28, 1–16 $\mu\text{mol/mL}$), grupos pré-tratados em Catepsina G registraram média de 26 sincícios contra 52 do grupo controle viral, redução de cerca de 50% (Figura 34, Núm. Sincícios). Em nenhuma das condições o número total de sincícios foi maior do que o registrado no grupo controle viral (52) e, concomitantemente, houve redução de cerca de 20% do tamanho médio dos sincícios, o que nos permite afirmar que a redução no número registrada pela quantificação não decorre da fusão de sincícios adjacentes (Figura 34, Tamanho). Na maior concentração testada o processo de quantificação não registrou sincício, nesse caso os demais índices também receberam o valor zero, pois, independente do denominador usado nas Equações 6.1 e 6.2, o resultado será zero.

Em relação a área ocupada por sincícios, os maiores valores compreendem os grupos incubados com as menores concentrações de Catepsina G, com média de 18% na faixa de 0,1–0,5 $\mu\text{mol/mL}$. Na faixa com as maiores concentrações, o valor médio da Área Relativa foi de 4,6%, ou seja, cerca de 1/4 dos 18,9% apresentado pelo controle viral (Figura 34, Área Relativa, 1–16 $\mu\text{mol/mL}$).

Embora a Catepsina G, diferente da Mieloperoxidase e Proteinase 3, tenha induzido efeito citotóxico e desafixação na monocamada de células HEp-2 na faixa de 8–16 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 17 e 25, destacado em verde), seu efeito na replicação do hRSV foi evidente, com drástica redução nas alterações morfológicas em todos os índices avaliados. Convém ressaltar que a pré-incubação do hRSV por 2 horas em 4 $\mu\text{mol/mL}$ de Catepsina G reduziu em 80% o número e 45% o

tamanho médio dos sincícios sem induzir efeito citotóxico, preservando cerca de 98% da monocamada.

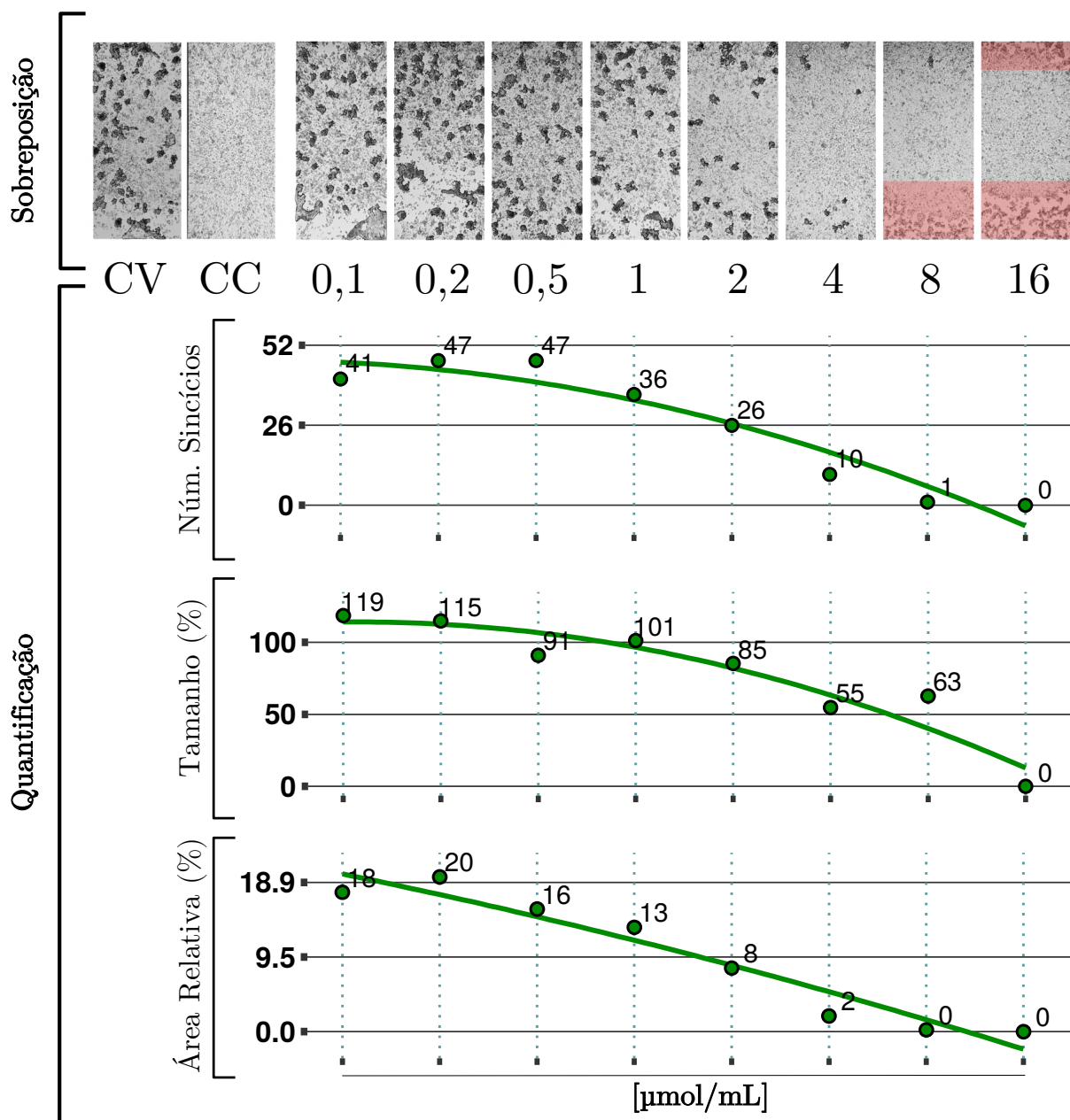


Figura 34 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Catepsina G. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito na seção 6.3.2, os dados do gráfico constam na Tabela 18. Fonte: o autor.

6.3.2.4 Quantificação sincicial do hRSV pré-incubado em Elastase

A quantificação das panorâmicas do ensaio de Alterações Morfológicas da Elastase seguiu os moldes dos ensaios anteriores (seção 6.3.2), todos os ajustes foram realizados intuindo obter a melhor sobreposição no grupo controle viral. A região destacada em vermelho corresponde a quantificação de um grupo onde houve extensa desafixação celular e, portanto, não deve ser considerada na quantificação, sua inclusão nessa figura serve apenas para demonstrar que a aglomeração celular pode erroneamente ser quantificada como sincício (Figura 35, 32 $\mu\text{mol/mL}$).

“This life’s hard, but it’s harder if you’re stupid”, (JOHN WAYNE, 1971).

A quantificação confirmou a redução na formação sincicial observada anteriormente (Figura 29, 4–16 $\mu\text{mol/mL}$), grupos pré-tratados em Elastase registraram média de 86 sincícios contra 143 do grupo controle viral, redução de cerca de 40% (Figura 35, Núm. Sincícios).

O tamanho médio dos sincícios na faixa que compreende as menores concentrações de Elastase foi de 103% (0,2–4 $\mu\text{mol/mL}$), dois grupos apresentaram tamanho médio maior do que o do controle viral (Figura 35, Tamanho, 2 e 4 $\mu\text{mol/mL}$). Nas maiores concentrações (8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$) a quantificação registrou evidente redução no tamanho médio dos sincícios, cerca de 1/4 quando comparado com o controle viral.

Em relação a área ocupada por sincícios, os maiores valores compreendem os grupos incubados com as menores concentrações de Elastase, com média de 15% na faixa de 0,2–2 $\mu\text{mol/mL}$. Apenas 2 grupos apresentaram aumento na Área Relativa quando comparado ao controle viral (Figura 35, Área Relativa, 0,5 e 2 $\mu\text{mol/mL}$). Na faixa com as maiores concentrações, o valor médio da Área Relativa foi de 2%, ou seja, cerca de 1/8 dos 16,1% apresentado pelo controle viral (Figura 35, Área Relativa, 4–16 $\mu\text{mol/mL}$).

A Elastase, assim como a Catepsina G, apresentou efeito citotóxico e induziu intensa desafixação celular nas maiores concentrações testadas 16–32 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 19 e 25, destacado em vermelho). Entretanto, na faixa de

8 a 16 $\mu\text{mol/mL}$ a quantificação registrou drástica redução todos os índices avaliados. Nessa faixa a pré-incubação do hRSV em Elastase por 2 horas reduziu a formação de sincícios em 99% e seu tamanho médio em 75% sem induzir desafixação, preservando cerca de 99% da monocamada.

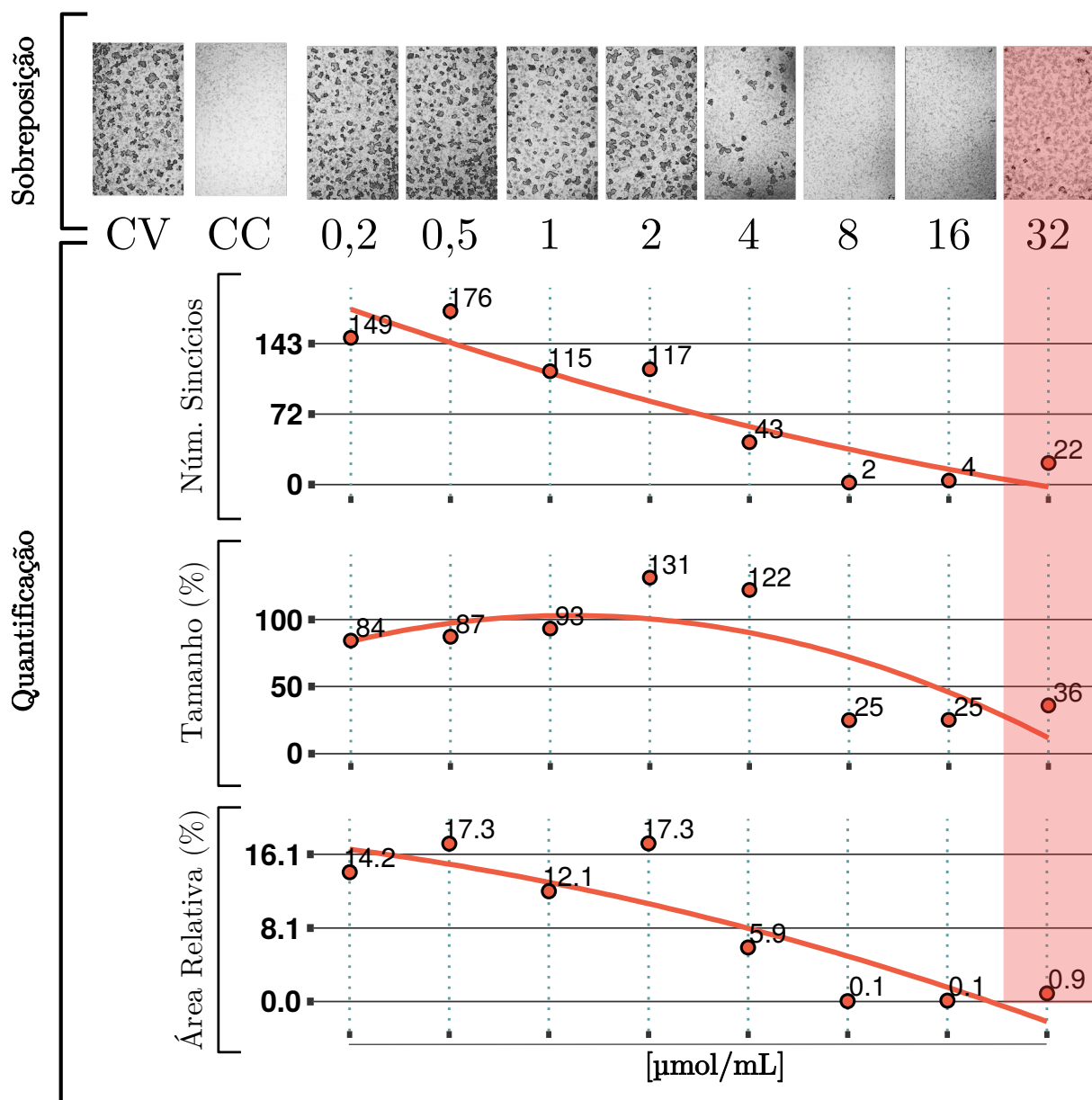


Figura 35 – Quantificação dos sincícios formadas pelo hRSV pré-incubado em Elastase. As panorâmicas foram processadas e os objetos identificados foram sobrepostos a imagem original com auxílio do GIMP. As monocamadas foram quantificadas como descrito na seção 6.3.2, os dados do gráfico constam na Tabela 19. Fonte: o autor.

6.3.3 Proteção Celular

O ensaio de Proteção Celular baseia-se na viabilidade celular inferida pelo metabolismo do MTT em monocamadas de células HEP-2. Como descrito anteriormente, a proliferação do hRSV induz efeito citopático, reduzindo a capacidade metabólica (Figura 20 e 22).

Para avaliar o efeito virucida das enzimas das NETs (Mieloperoxidase, Catepsina G, Proteinase 3 e Elastase), monocamadadas de HEP-2 foram inoculadas com a TCID₅₀ de hRSV pré-incubado com diversas concentrações de cada uma dessas enzimas por 2 horas a 37 °C. Durante esse período, as enzimas podem interagir com as proteínas de superfície do vírion, alterando seu funcionamento, quanto maior a capacidade virucida da enzima, menor será a replicação viral e, conseqüentemente, menor será os efeitos deletério oriundos dessa replicação (formação de sincícios e/ou redução do metabolismo).

O metabolismo das monocamadas foram avaliados 72 horas após a infecção pelo Ensaio de Viabilidade e as absorbâncias foram convertidas em índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2, onde a média aritmética do grupo controle celular (somente HEP-2 e meio de cultivo) “CC” assumirá sempre o valor de 100% e a média aritmética do grupo controle de replicação viral (HEP-2, TCID₅₀ de hRSV e meio de cultivo) “CV” assumirá sempre o valor de 0%. O Índice de Proteção Celular, diferentemente dos valores das absorbâncias, é um índice relativo e pode assumir valores negativos caso a proteína ou composto exerça efeito citotóxico e/ou atue promovendo a replicação viral.

Baseado nas propriedades do índice de Proteção Celular (valores fixos para a média aritmética dos controles) os valores dos controles foram convertidos em retângulos no gráfico para facilitar a visualização, azul para o controle de viabilidade (CC) e cinza para o controle de replicação (CV), a posição representa o valor médio de cada grupo e a altura representa o respectivo desvio padrão (Figura 36).

Os dados de Proteção Celular foram interpolados por uma curva polinomial e dois importantes índices foram calculados: CP50 e CE50. A Concentração de Proteção 50% (CP50) corresponde ao valor da concentração em que a enzima/composto protegeu a monocamada, reduzindo o efeito da replicação viral

50% do total (Figura 36, destacado em vermelho). A Concentração Efetiva 50% (CE50) pode ser obtida pela Equação 6.3, e corresponde a metade do valor da concentração em que a enzima/composto apresentou máxima proteção (Figura 36, destacado em azul).

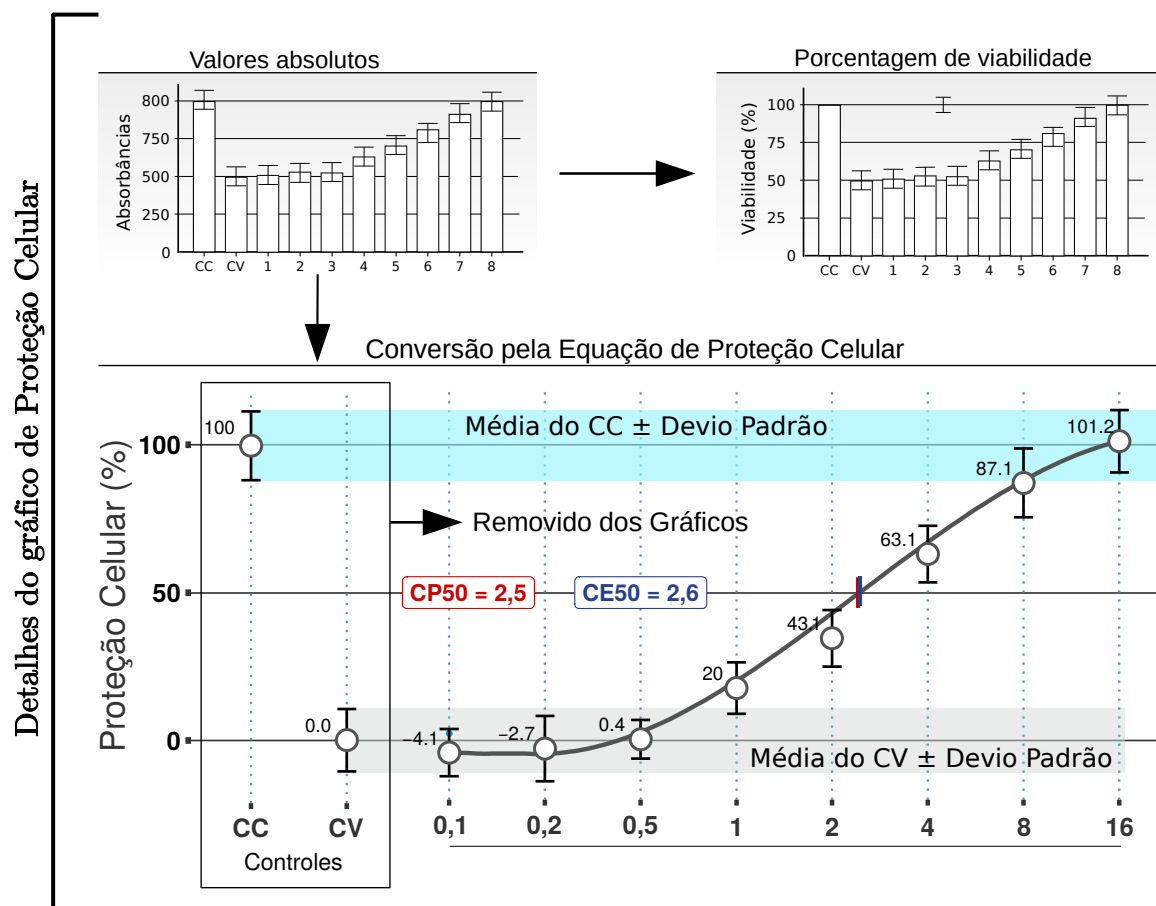


Figura 36 – Detalhes do gráfico de Proteção Celular. Após o protocolo de de Proteção Celular (seção 5.7.2) as absorbâncias foram convertidas em índice de Proteção Celular (Equação 5.2), a média aritmética dos controles ± o desvio padrão foram convertidos em faixas (Azul para CC e cinza para CV). Fonte: o autor.

$$\text{Concentração Efetiva 50 (\%)} = \left(\frac{MP_r}{2} \right) \quad (6.3)$$

Sendo:

MP_r O valor da concentração de máxima proteção registrada.

6.3.3.1 Proteção Celular: Ribavirina

A escassez de drogas aprovadas para o tratamento do hRSV intrinsecamente justificaria a elevada incidência do uso da Ribavirina como controle anti-hRSV na literatura, entretanto, os diversos mecanismos de ação da Ribavirina a tornam uma droga extremamente robusta para ensaios *in vitro*^[80,95,128]. Dentre seus efeitos na replicação viral, podemos destacar a alta taxa de mutação induzida pela substituição da guanosina pela Ribavirina com concomitantemente redução da atividade enzimática de componentes da cascata de biossíntese de bases purina como a Inosina Monofosfato Desidrogenase (Figura 37).

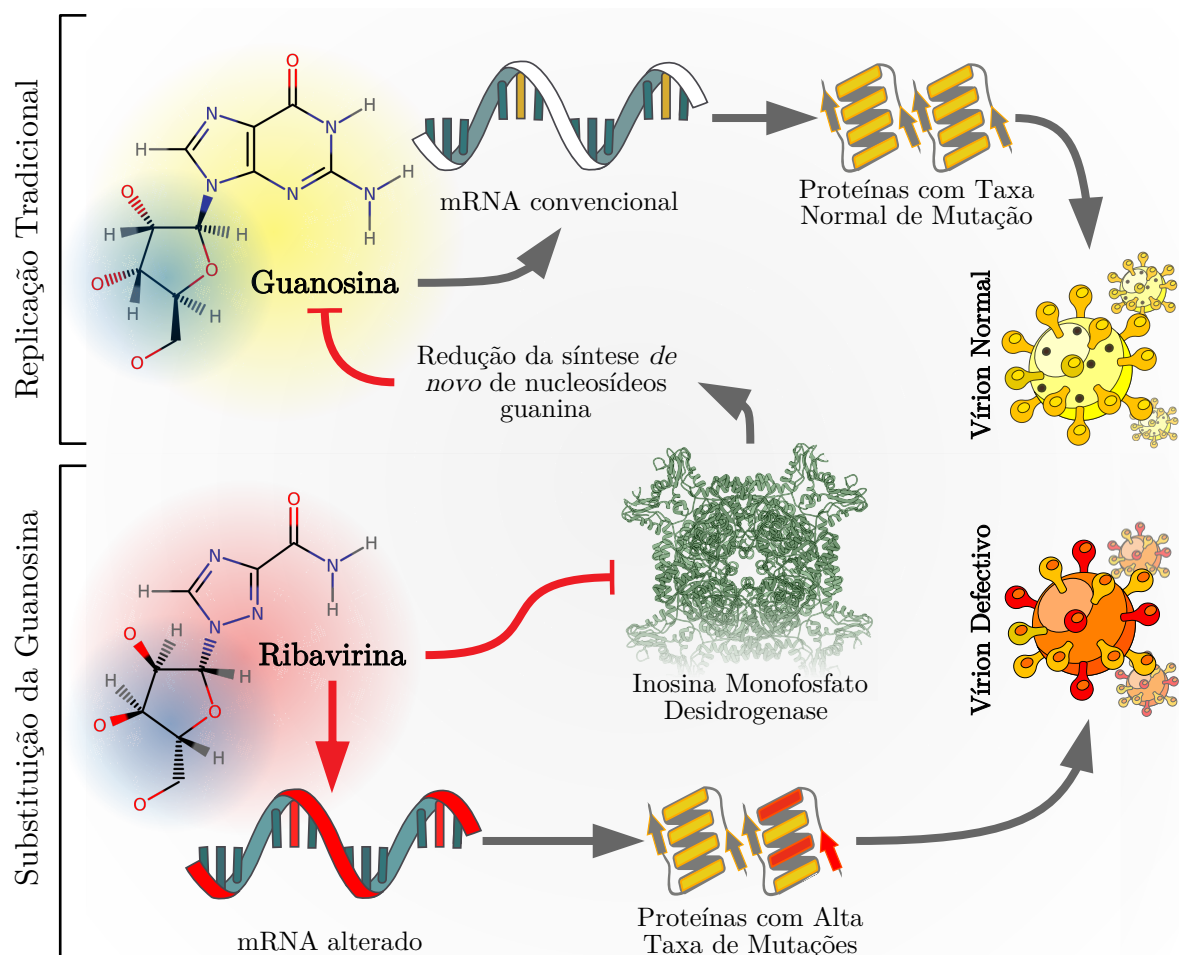


Figura 37 – Principais mecanismos de ação da Ribavirina. A substituição da Guanosina pela Ribavirina aumenta expressivamente a taxa de mutação do mRNA, alterando a estrutura das proteínas virais, concomitantemente, devido a alta afinidade com a Inosina Monofosfato Desidrogenase, a presença de Ribavirina no citosol reduz a produção de guanosina. Fonte: o autor.

A Inosina Monofosfato Desidrogenase cataliza a síntese *de novo* de nucleosídeos guanina, no citosol a Ribavirina é rapidamente fosforilada e interage com a Inosina Monofosfato Desidrogenase, reduzindo sua função^[129].

O efeito anti-hRSV da Ribavirina foi avaliado na faixa de concentração não tóxica (Figura 9, 8–640 $\mu\text{mol/mL}$). HEp-2 foram inoculadas com a TCID50 de hRSV por 2 h, em seguida receberam as concentrações de Ribavirina e foram incubadas por 72 h. A viabilidade celular foi mensurada e os valores das absorbâncias foram convertidos em índice de Proteção Celular (Equação 5.2).

A Ribavirina protegeu monocamadas de HEp-2 pré-incubadas com a TCID50 do hRSV, a CP50 foi determinada em 25 $\mu\text{mol/mL}$ e a CE50 em 18 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 38).

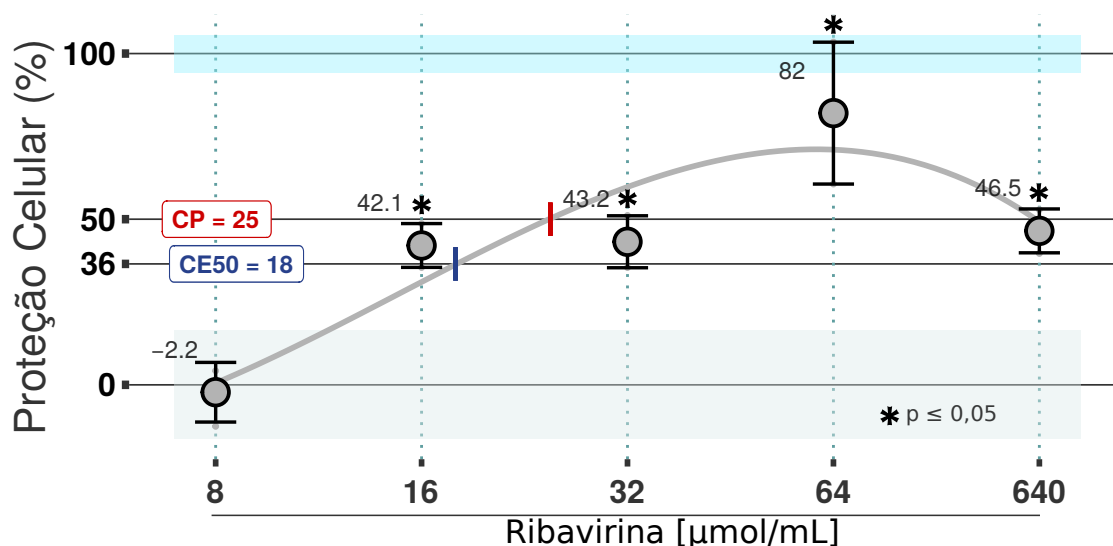


Figura 38 – Proteção Celular da Ribavirina. Monocamadas de HEp-2 foram inoculadas com hRSV e em seguida pós-tratadas com diversas concentrações de Ribavirina (8–640 $\mu\text{mol/mL}$). A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 10. Fonte: o autor.

Os valores de CP50 e CE50 para a atividade anti-hRSV da Ribavirina aqui descritos harmonizam com os valores descritos na literatura^[130,131]. Rasmussen et al.^[91] estabeleceram a CP50 da Ribavirina sob células HEp-2 em 31 $\mu\text{mol/mL}$, além disso os valores de proteção aqui estabelecidos (Figura 38) estão dentro da faixa de concentração de proteção da Ribavirina em amostras de isolados clínicos de hRSV (2–251 $\mu\text{mol/mL}$)^[98].

6.3.3.2 Proteção Celular: Palivizumabe

A proteína de fusão do hRSV (hRSV F) possui duas conformações predominantes pré e pós-fusão e, embora os mecanismos que desencadeiam essas alterações conformacionais ainda não estejam bem descritos, considera-se que a conformação pós-fusão é a única capaz de realizar a fusão.

O Palivizumabe interage com um sítio antigênico conservado presente em ambas conformações (sítio II) da hRSV F, formado um complexo estável que dificulta a aproximação da hRSV F com a membrana da célula e, conseqüentemente, restringindo seu funcionamento (Figura 39).

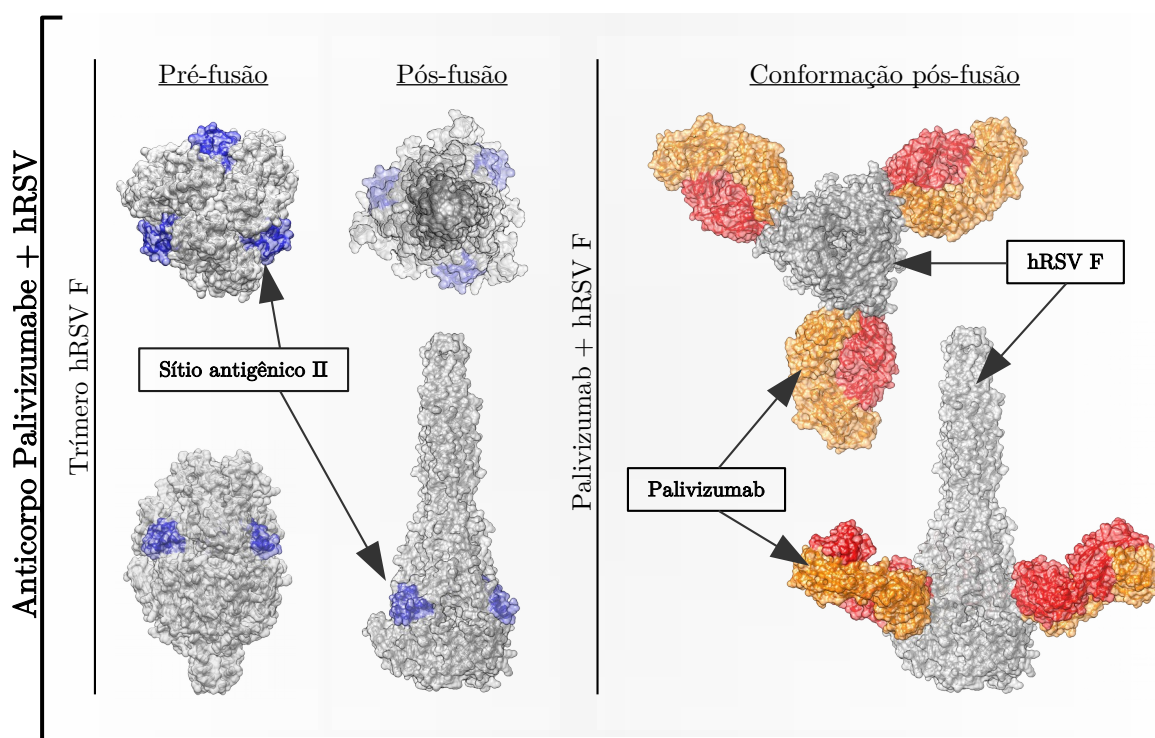


Figura 39 – Interação entre o Palivizumabe e a Proteína de Fusão do hRSV. O trímero que compõem a proteína de fusão do hRSV apresenta 2 estados conformacionais predominantes, pré e pós-fusão. O Palivizumabe pode se ligar em ambas conformações, pois foi desenvolvido para interagir com um epítipo conservado entre as conformações, o sítio antigênico II (destacado em azul). Fonte: o autor.

Embora existam diversos anticorpos desenvolvidos para atuar de modo similar ao Palivizumabe, a grande maioria não é aprovada — ou é descontinuada — devido ao elevado índice de reações adversas e/ou menor eficácia demonstrada

durante as etapas de ensaios clínicos [69]. Até mesmo anticorpos derivados do Palivizumabe como o Motavizumbe (MEDI-524) foram descontinuados devido a maior incidência de reações adversas como hipersensibilidade cutânea [132,133].

O efeito anti-hRSV do Palivizumabe foi avaliado na faixa de concentração não tóxica (Figura 11, 0,2–10 $\mu\text{mol/mL}$). HEp-2 foram inoculadas com a TCID50 de hRSV pré-incubada em diferentes concentrações de Palivizumabe por 2 h, em seguida o inóculo foi substituído por meio de cultivo e as monocamadas foram incubadas por 72 h.

O Palivizumabe exerceu efeito protetivo em monocamadas de HEp-2 pré-incubadas com a TCID50 do hRSV, o valor da CP50 e CE50 foi determinado em 0,7 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 40).

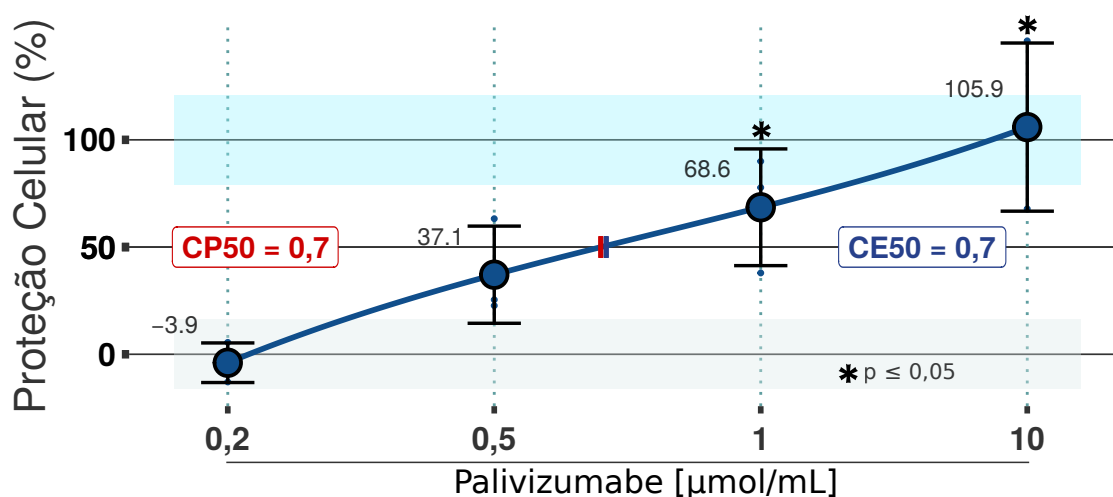


Figura 40 – Proteção Celular do Palivizumabe. O hRSV foi pré-incubado em concentrações de Palivizumabe por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas conforme a Equação 5.2. Os dados constam na Tabela 11. Fonte: o autor.

Os valores de CP50 e CE50 para a atividade anti-hRSV do Palivizumabe determinados aqui harmonizam com os valores descritos na literatura (0,3–2,2 $\mu\text{mol/mL}$) [134–136]. A bula do medicamento estabelece a CE50 via ensaio imunoenzimático na faixa de 1,8–4 $\mu\text{mol/mL}$, discrepâncias nesse valor podem ocorrer devido ao tipo de ensaio utilizado, entretanto, os valores de proteção aqui estabelecidos (Figura 40) conciliam com a faixa de concentração de proteção determinadas em amostras de isolados clínicos de hRSV (0,4–19 $\mu\text{mol/mL}$) [137].

6.3.3.3 Proteção Celular: Mieloperoxidase

Embora escassos os trabalhos que descrevem a ação virucida da Mieloperoxidase, a literatura relacionada aos mecanismos de produção de espécies altamente reativas e seu papel na digestão de partículas é vasta^[138–140]. Dentre os principais mecanismos microbicidas da Mieloperoxidase, cabe ressaltar a síntese do ácido hipocloroso (HClO) que é, indiscutivelmente, o mais potente agente microbicida produzido por mamíferos^[140, 141].

A produção do ácido hipocloroso mediada pela Mieloperoxidase depende do peróxido de hidrogênio que normalmente é produzido a partir de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados pelo complexo NADPH oxidase (NOX2)^[142]. Esse complexo que se forma na membrana do fagossomo durante a degradação de partículas fagocitadas é composto por 6 subunidades que catalisam a produção de superóxidos ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ etc) em um fenômeno descrito como *Respiratory Burst*, em tradução livre "Explosão Respiratória"^[143].

Durante o processo de formação da NET, grânulos do citosol se fundem ao núcleo celular, propiciando condição semelhante a encontrada no fagossomo ativo. Nesse contexto, as ROS podem ser convertidas por enzimas como a Superóxido Desmutase, gerando H_2O_2 requerido para a produção do HClO pela Mieloperoxidase^[140]. Embora o H_2O_2 seja consumido nessa reação — o H_2O_2 possui relevante efeito microbicida — o produto gerado (HClO) é extremamente mais tóxico e sua biossíntese é classificada como o maior avanço evolutivo na competência degradativa dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos)^[141, 144].

A ação da Mieloperoxidase não se restringe ao citosol, diversas funções extracelulares (imunomodulação, catálise de agentes microbicidas, quebra de DNA e RNA etc) foram descritas^[139]. Intrigantemente, a Mieloperoxidase extracelular pode ser internalizada e voltar a atuar no citosol, estimulando a proliferação celular e angiogênese *in vitro* e *in vivo*^[145].

Nesse trabalho, a atividade anti-hRSV da Mieloperoxidase foi avaliada na faixa de concentração não tóxica (Figura 13, 0,2–32 $\mu\text{mol/mL}$). HEp-2 foram inoculadas com a TCID50 de hRSV pré-incubada em diferentes concentrações de Mieloperoxidase por 2 h, em seguida o inoculo foi substituído por meio de cultivo e as monocamadas foram incubadas por 72 h.

A Mieloperoxidase não exerceu efeito protetivo relevante em células HEp-2 incubadas com a TCID50 do hRSV, o valor máximo de proteção foi de 31% na concentração de 32 $\mu\text{mol/mL}$, então a CE50 (15,5% de proteção) foi determinada em 7,8 $\mu\text{mol/mL}$ e a CP50 não pôde ser determinada (Figura 41).

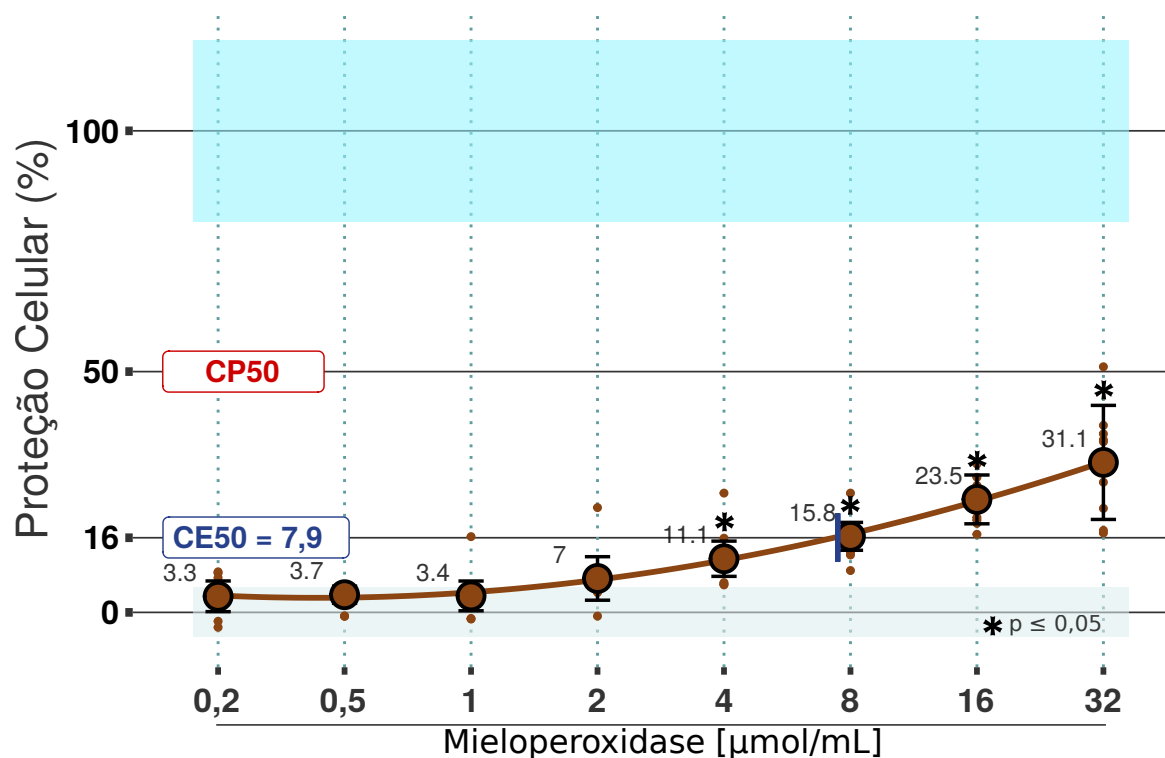


Figura 41 – Proteção Celular da Mieloperoxidase. O hRSV foi pré-incubado em Mieloperoxidase (0,2–32 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção. Os dados do gráfico constam na Tabela 12. Fonte: o autor.

Embora não tenha sido possível determinar o valor da CP50 na faixa de concentrações testadas, ao analisar o gráfico nota-se proteção nas maiores concentrações (Figura 41, 4–32 $\mu\text{mol/mL}$).

A ausência de relevante atividade anti-hRSV da Mieloperoxidase demonstrada pelo ensaio de Proteção Celular corroboram os resultados de ensaios anteriores, a Mieloperoxidase não preservou o aspecto de monocamadas no ensaio de Alterações Morfológicas (Figura 26) e, não reduziu o número de sincícios no ensaio de Quantificação Sincicial (Figura 32, Número de Sincícios), consolidam um exíguo efeito anti-hRSV da Mieloperoxidase nas condições testadas.

6.3.3.4 Proteção Celular: Proteinase 3

As serino proteases possuem diversas propriedades antimicrobianas, dentre as quais cabe destacar a produção de peptídeos antimicrobianos e inativação por clivagem direta. Também modulam o processo inflamatório pela ativação dos *Protease-activated receptors* (PARs), em tradução livre “Receptores ativados por proteases”^[146]. Distribuídos em quatro classes, os PARs podem ser considerados receptores transmembrana de proteases extracelular, capazes de desencadear diversas respostas relacionadas ao contexto imune e tipo tecidual^[147].

No trato respiratório, a ativação dos PARs pode ter efeito pro ou anti-inflamatório. A ativação de PARs do tipo 1 (PARs-1) normalmente culmina no aumento das interleucinas (IL) 6 e 8, aumento da liberação de prostanoídes e consequente broncoconstrição^[148]. Nos pulmões, os PARs do tipo 2 (PARs-2) são especialmente abundantes e sua ativação é relacionada com efeito protetivo do epitélio pulmonar e broncodilatação^[149–151].

A Proteinase 3 pode clivar os PARs 1 e 2 e, desde sua descrição em 1988 (indução de enfisema em hamster)^[107], é associada a patologias relacionadas a degradação e disfunção do tecido pulmonar, principalmente devido ao fato de ser expressa constitutivamente na superfície dos neutrófilos e clivar a elastina. A Proteinase 3, diferentemente das demais serinoproteases (Catepsina G e Elastase), não é inibida por DNA e seu efeito tende a ser ainda mais relevante no contexto da formação das NETs^[123].

Outros autores entretanto, ressaltam que a capacidade catalítica da Proteinase 3 pode ser considerada modesta quando comparada a Catepsina G e Elastase (que clivam muito mais eficientemente a elastina). Alguns trabalhos descrevem que, em condições normais, a Proteinase 3 expressa na membrana é praticamente inibida pelo α_1 -PI e que as complicações associadas a da ação da Proteinase 3 decorrem da suscetibilidade de cada indivíduo^[110,152].

Nesse trabalho, o efeito da Proteinase 3 na replicação do hRSV foi avaliado *in vitro* na faixa de concentração não tóxica (Figura 15, 0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$). HEp-2 foram inoculadas com a TCID₅₀ de hRSV pré-incubada em diferentes concentrações de Proteinase 3 por 2 h, em seguida o inoculo foi substituído por meio de cultivo e as monocamadas foram incubadas por 72 h.

A Proteinase 3 exerceu excelente efeito protetivo em células HEp-2 incubadas com a TCID₅₀ do hRSV, na faixa com as maiores concentrações a proteção média foi de 76% (Figura 42, 2–16 $\mu\text{mol/mL}$). Nas menores concentrações testadas não houve efeito protetivo (0,1–1 $\mu\text{mol/mL}$), o valor da CP50 e CE50 foi estabelecido em 2,5 e 2,6 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente (Figura 42).

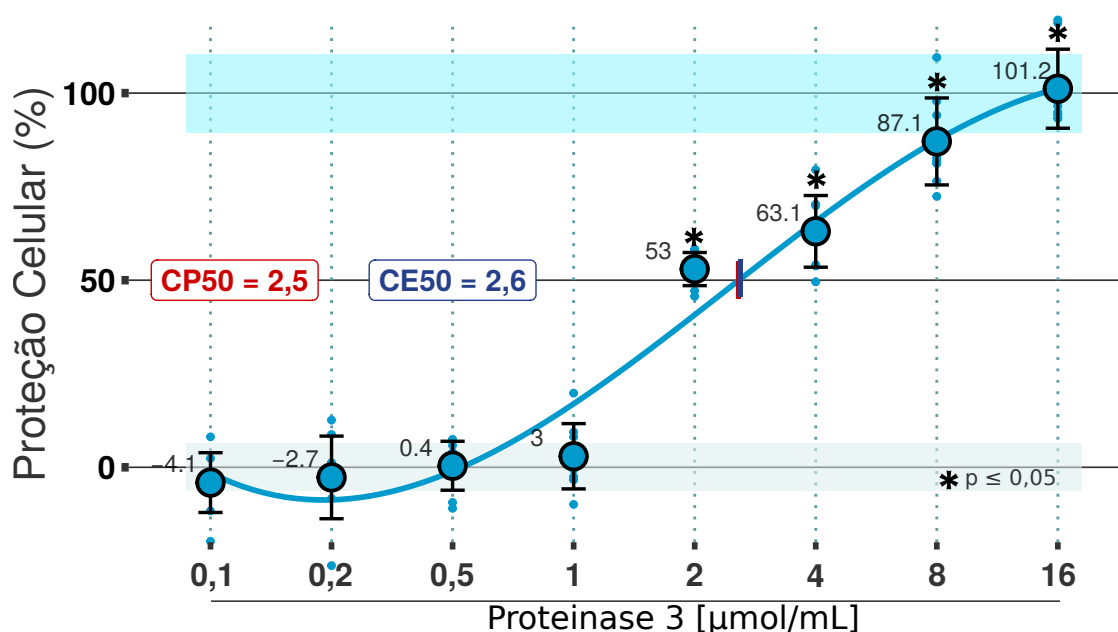


Figura 42 – Proteção Celular da Proteinase 3. O hRSV foi pré-incubado em diferentes concentrações de Proteinase 3 (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas no índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 13. Fonte: o autor.

Os resultados do ensaio de Proteção Celular corroboram parcialmente com o descrito em ensaios anteriores, maiores concentrações de Proteinase 3 reduziram visivelmente a formação de sincícios no ensaio de Alterações Morfológicas (Figura 27) e reduziram em mais de 50% o tamanho médio e a área total ocupada por sincícios (Figura 35).

A proteção de média de 94% (8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$) excedeu as expectativas, principalmente pela presença de sincícios nessas concentrações (Figura 27), entretanto, ao analisar a integridade da monocamada no ensaio de Alterações Morfológicas nota-se que, na faixa de 2-16 $\mu\text{mol/mL}$, grande parte da monocamada permanece contígua, o que certamente contribui em seu metabolismo.

6.3.3.5 Proteção Celular: Catepsina G

Dentre as serino proteases testadas, a Catepsina G é a que possui maior distinção quanto a estrutura primária e, assim como a Proteinase 3, exerce atividade antimicrobiana via clivagem direta e pela produção de peptídeos antimicrobianos [153]. De fato, a Catepsina G não depende de sua capacidade catalítica para exercer atividade microbicida, pequenos peptídeos oriundos da digestão da Catepsina G, gerados por proteases bacterianas ou isolados a partir de neutrófilos não ativos, possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro [154, 155].

A Catepsina G desempenha relevante papel na modulação da resposta inflamatória, seja pela clivagem direta de mediadores como a IL 1 ou pela ativação de PARs do tipo 1, 2 e 3 [156]. A Catepsina G atua também na regulação da pressão sanguínea e na liberação de vasopressinas pela conversão do Angiotensinogênio (Angiotensina 1) em Angiotensina 2 (forma ativa), além de promover a agregação plaquetária [157].

No trato respiratório a Catepsina G desempenha papel relevante, principalmente no contexto de patologias pulmonares crônicas como a Fibrose Cística, atua diretamente em glândulas responsáveis pela secreção de muco, aumentando sua produção e, conseqüentemente, contribuindo para o agravamento do quadro clínico decorrente de déficit respiratório [158]. A Catepsina G aumenta a permeabilidade em pneumócitos, favorecendo o influxo de células imunes e plasma, no contexto das NET, sua atividade pode ser utilizada como um importante marcador inflamação das vias aéreas [159, 160].

A CSTG exerce ainda atividade antiinflamatória, reduzindo a responsividade de neutrófilos a elementos proinflamatórios da cascata do complemento como o C5a [125]. Além disso a Catepsina G — devido a sua composição primária — pode formar complexos de alta afinidade com o DNA, entretanto, o efeito dessa associação na atividade da Catepsina G ainda é controverso [123, 161].

No presente trabalho, o efeito anti-hRSV do Catepsina G foi avaliado na faixa de 0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 17). HEp-2 foram inoculadas com a TCID50 de hRSV pré-incubada em diferentes concentrações de Catepsina G por 2 h, em seguida o inoculo foi substituído por meio de cultivo e as monocamadas foram incubadas por 72 h.

As menores concentrações de Catepsina G (0,1–0,5 $\mu\text{mol/mL}$) não apresentaram relevante efeito anti-hRSV, com proteção média aproximada de 10%. Na faixa intermediária de 1–4 $\mu\text{mol/mL}$ houve proteção relevante (maior que 50%), com média de 60% (Figura 43). Nas maiores concentrações testadas (8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$) houve efeito protetivo, entretanto, a regressão indica uma tendência de queda na proteção em valores maiores do que 4 $\mu\text{mol/mL}$. O valor da CP50 foi estabelecido em 1,2 $\mu\text{mol/mL}$ e a CE50 (33% de proteção) em 0,64 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 43).

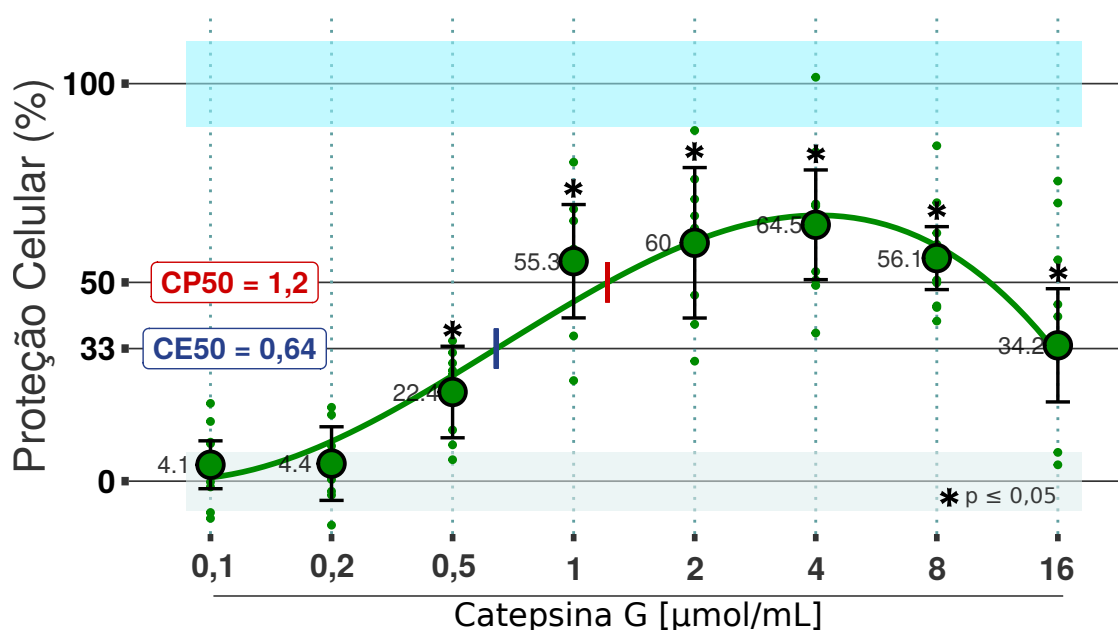


Figura 43 – Proteção Celular da Catepsina G. O hRSV foi pré-incubado em diferentes concentrações de Catepsina G (0,1–16 $\mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorvâncias convertidas no índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 14. Fonte: o autor.

A Catepsina G apresentou relevante citotoxicidade no ensaio de CC50 e desafixação celular no ensaio de Alterações Morfológicas nas concentrações de 8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 17 e 28), portanto, a redução na proteção observada nesses concentrações provavelmente se deve a sobreposição do efeito direto da Catepsina G sob monocamada, visto que na faixa de 1–16 $\mu\text{mol/mL}$ houve evidente redução na formação de sincícios (Figura 28), cabe ressaltar que, na concentração com maior proteção (4 $\mu\text{mol/mL}$), a redução na área relativa ocupada por sincícios foi próxima de 90% (Figura 34, Área Relativa).

6.3.3.6 Proteção Celular: Elastase

Sendo uma das serino proteases mais bem estudadas, a Elastase (Elastase) possui diversas funções fisiológicas descritas, atuando na cicatrização, hidrolisando proteínas da matriz extracelular e, assim como as demais serino proteases (Catepsina G e Proteinase 3), exercendo atividade antimicrobiana^[162,163]. Embora a eficácia proteolítica varie em função das condições físico-químicas e de substrato, a Elastase é considerada uma enzima de alta atividade e baixa especificidade, com centenas de substratos descritos^[164,165].

A ação microbicida da Elastase é certamente a mais bem descrita dentre as serino proteases, diversos trabalhos descrevem efeito direto e indireto de sua atividade proteolítica^[66,166,167]. Atua no contexto inflamatório via processamento de quimiocinas e citocinas, degradação e ativação de receptores como os PARs 1 e 2^[168,169].

No trato respiratório a Elastase exerce efeito predominantemente pro-inflamatório e, no contexto de patologias pulmonares crônicas (ou outra condição inflamatória persistente), é associada a grande parte do dano tecidual principalmente devido a sua capacidade proteolítica. Alguns trabalhos descrevem efeito solubilizante da Elastase sob o espesso muco característico da fibrose cística, entretanto, as consequências dessa de atividade ainda estão bem descritas^[170].

Sabe-se que durante a formação das NETs os grânulos azurofílicos migram em direção ao núcleo onde secretam suas enzimas e a Elastase promove a degradação do citoesqueleto via digestão da actina e auxilia a descondensação do DNA pela degradação das histonas^[67,68].

No presente trabalho, o efeito anti-hRSV do Elastase foi avaliado na faixa de 0,2–32 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 19). HEp-2 foram inoculadas com a TCID50 de hRSV pré-incubada em diferentes concentrações de Elastase por 2 h, em seguida o inóculo foi substituído por meio de cultivo e as monocamadas foram incubadas por 72 h.

Nas menores concentrações de Elastase (0,2–2 $\mu\text{mol/mL}$) houve pouca redução na replicação do hRSV, com proteção média aproximada de 17%. Na faixa intermediária de 4–16 $\mu\text{mol/mL}$ houve proteção relevante, com média de 70% (Figura 44). Na faixa das maiores concentrações (8 e 32 $\mu\text{mol/mL}$) o efeito

protetivo teve uma tendência de redução, assim como o descrito na proteção da Catepsina G. O valor da CP50 foi estabelecido em $2,2 \mu\text{mol/mL}$ e a CE50 (35% de proteção) em $1,4 \mu\text{mol/mL}$ (Figura 44).

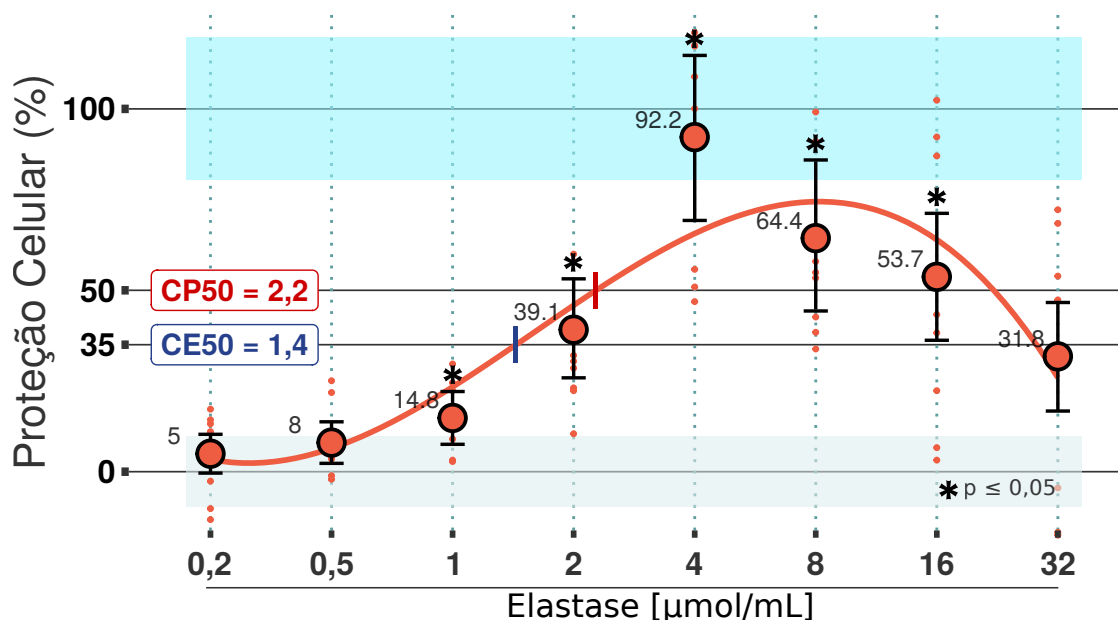


Figura 44 – Proteção Celular da Elastase. O hRSV foi pré-incubado em diferentes concentrações de Elastase ($0,2\text{--}32 \mu\text{mol/mL}$) por 2 horas e em seguida inoculado em monocamadas de células HEp-2. A viabilidade foi mensurada 72 horas pós-infecção e as absorbâncias convertidas no índice de Proteção Celular conforme a Equação 5.2. Os dados do gráfico constam na Tabela 15. Fonte: o autor.

Os resultados do ensaio de Proteção Celular harmonizam com os ensaios anteriores, maiores concentrações de Elastase reduziram visivelmente a formação de sincícios (Figura 29, $4\text{--}16 \mu\text{mol/mL}$) e reduziram em mais de 80% a área total ocupada por sincícios (Figura 35, $4\text{--}16 \mu\text{mol/mL}$), entretanto, a Elastase induziu relevante citotoxicidade e desafixação celular em células HEp-2 (Figura 19 e 25, 16 e $32 \mu\text{mol/mL}$), o que pode justificar a redução na proteção observada nesses concentrações.

A excelente proteção apresentada na concentração de $4 \mu\text{mol/mL}$ é corroborada por todos os demais ensaios da Elastase, evidente redução visual, redução em todos os índices de quantificação sem induzir efeito citotóxico.

6.3.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Diante dos resultados obtidos nos ensaios anteriores, nos pareceu evidente que as enzimas aqui estudadas exercem efeito sobre a partícula viral de hRSV. Como mencionado ao longo deste trabalho, a proteína F viral tem sido um alvo farmacológico no desenvolvimento de drogas que possam inibir a replicação viral, visto que esta proteína se mostrou fundamental nos processos iniciais de infecção viral (adesão e fusão viral). Assim, supomos que as enzimas das NETs, aqui estudadas, pudessem interagir diretamente com a proteína F viral clivando-a. Este evento talvez desabilitasse a partícula viral a infectar novas células, explicando assim os efeitos antivirais observados por nós durante os ensaios *in vitro*. O perfil eletroforético da r hRSV F fornecido pelo fabricante pode ser analisado na Figura 45.

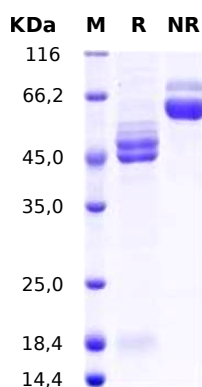


Figura 45 – Perfil eletroforético da proteína r hRSV F fornecido pelo fabricante. M indica a faixa do marcador de peso molecular, R a faixa onde a proteína foi incubada em condição redutora e NR a faixa em condição não redutora. Fonte: Sino Biological.

Para que nossa hipótese fosse testada, proteína F viral recombinante foi adquirida e incubada com as diferentes enzimas durante 2 horas. As moléculas foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito em na seção 5.7.3, intuindo avaliar o perfil eletroforético resultante de uma possível interação entre essas moléculas. Os géis foram corados com nitrato de prata dada sua maior sensibilidade comparada à coloração com azul de coomassie. A densitometria das bandas aparentes no gel foi avaliada com o auxílio do software IMAGEJ.

A forma de processamento e o perfil eletroforético da proteína F em nossas

condições experimentais pode ser avaliado na Figura 46. A imagem do gel à esquerda da figura apresenta em seu primeiro poço o padrão eletroforético do marcador molecular (L de ladder), seguido pelo poço contendo a proteína F viral, onde podemos observar uma banda de alto peso molecular (≈ 150 kDa) e outra de menor peso (≈ 60 kDa). Veremos adiante que o posicionamento e a nitidez destas bandas variam bastante, dependendo do quão estendida foi a corrida no gel. No centro da Figura 46 é possível observar como foi realizado a seleção das faixas a serem consideradas no cálculo densitométrico. Essa é uma etapa delicada, pois as seleções devem estar alinhadas e ter a mesma área. À direita, os gráficos densitométricos das bandas aparentes de cada faixa.

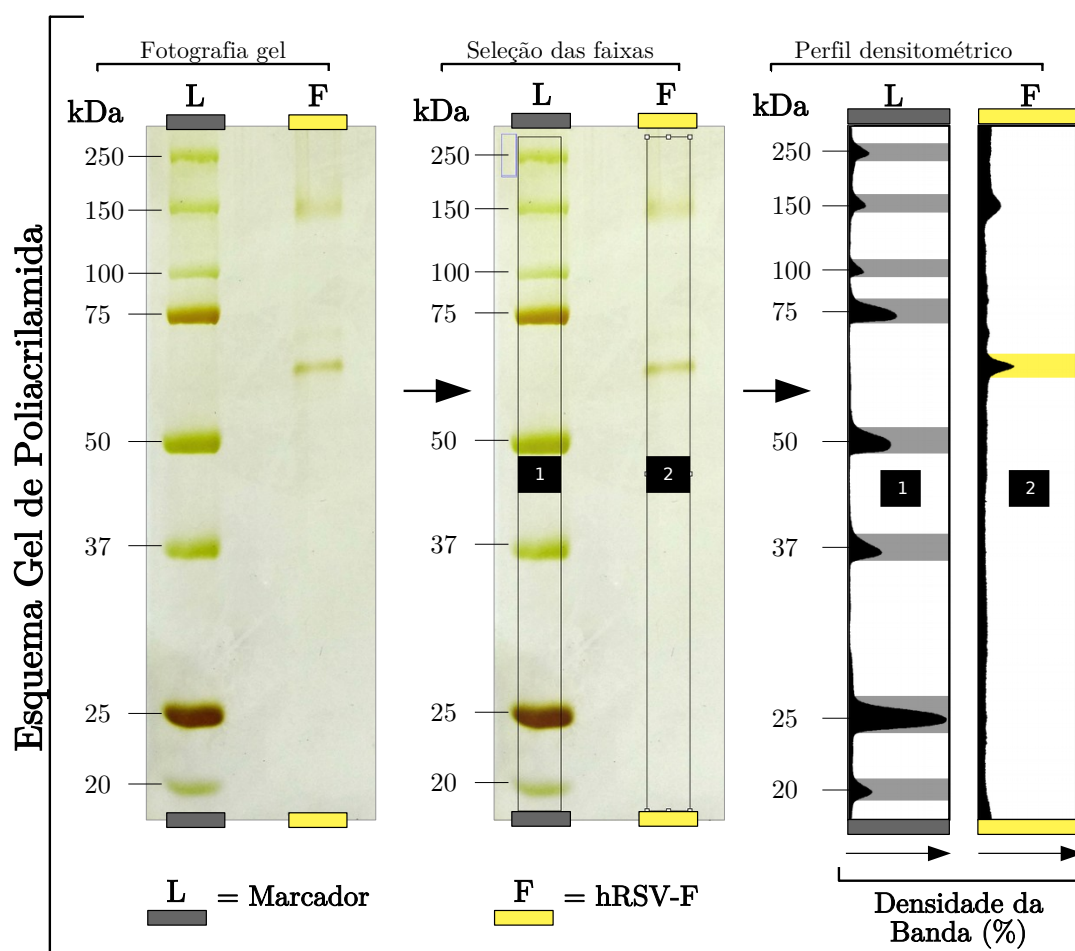


Figura 46 – Esquema gel de poliacrilamida. Após o protocolo de coloração com nitrato de prata as faixas foram selecionadas (1, Marcador; 2, hRSV-F e os demais números para as proteínas teste), os picos foram identificados com auxílio dos gráficos densitométricos calculados pela função “Plot Lanes” do software IMAGEJ. Fonte: o autor.

6.3.4.1 Eletroforese Mieloperoxidase

A primeira enzima a ser testada, Mieloperoxidase, foi incubada com 500 ng de proteína F viral em 3 diferentes concentrações: 1600, 160 e 16 ng. Após duas horas a solução foi separada em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi corado por nitrato de prata conforme descrito em na seção 5.7.3.

Intuindo evidenciar os resultados apresentadas na fotografia do gel, o perfil densitométrico foi calculado e disposto à direita da fotografia original. Os dados referentes aos picos auxiliam a interpretação da fotografia original, tornando mais evidente a posição, tamanho e intensidade da banda, nesse caso, utilizaremos predominantemente o densitograma para discutir os padrões de banda. Cabe ressaltar que o densitograma se refere a fotografia original (disposta à esquerda) sem nenhum ajuste de brilho ou contraste.

Na Figura 47, observando a fotografia do gel, a primeira faixa evidencia o perfil de bandas do marcador de peso molecular (L), a segunda mostra o perfil da proteína r hRSV F isolada (500 ng), na terceira o perfil da Mieloperoxidase isolada (1600 ng) e nas últimas, o perfil da solução de r hRSV F (500 ng) incubado em diversas concentrações de Mieloperoxidase (16–1600 ng) por duas horas a 37 °C, apresentadas em ordem decrescente de Mieloperoxidase.

Os três controles exibiram o padrão de distribuição de bandas esperado. O marcador (L) e a Mieloperoxidase isolada (M) não estão com boa nitidez, mas é possível identificar todos os picos do marcador e uma banda intensa com pico de ≈ 150 kDa na faixa M. Na faixa da r hRSV F identifica-se apenas a banda com menor peso molecular com intensidade moderada (Figura 47)

A incubação destas moléculas induz alterações de intensidade neste padrão, de modo que: (1) uma banda com peso molecular de ≈ 250 kDa torna-se visível à medida que a concentração de Mieloperoxidase também aumenta (Figura 47, faixa vermelha, densitometria) e, (2) inversamente, a banda de menor peso molecular da r hRSV F (≈ 75 kDa) perde intensidade à medida que a concentração de Mieloperoxidase aumenta (Figura 47, faixa amarela, densitometria). Como esperado, a intensidade da banda referente a Mieloperoxidase foi proporcional à concentração aplicada no gel (Figura 47, destacado em tons de marrom, densitometria).

Numa avaliação preliminar, a dinâmica apresentada pelas bandas das moléculas sugere uma interação inespecífica entre a Mieloperoxidase e a r hRSV F, sem clivagem. Aparentemente, a porção de menor peso molecular está interagindo/agregando com a enzima e formando moléculas de peso molecular elevado (≈ 250 kDa). Entretanto, no momento não podemos afirmar se a banda de maior peso molecular da proteína F estaria participando deste agregado.

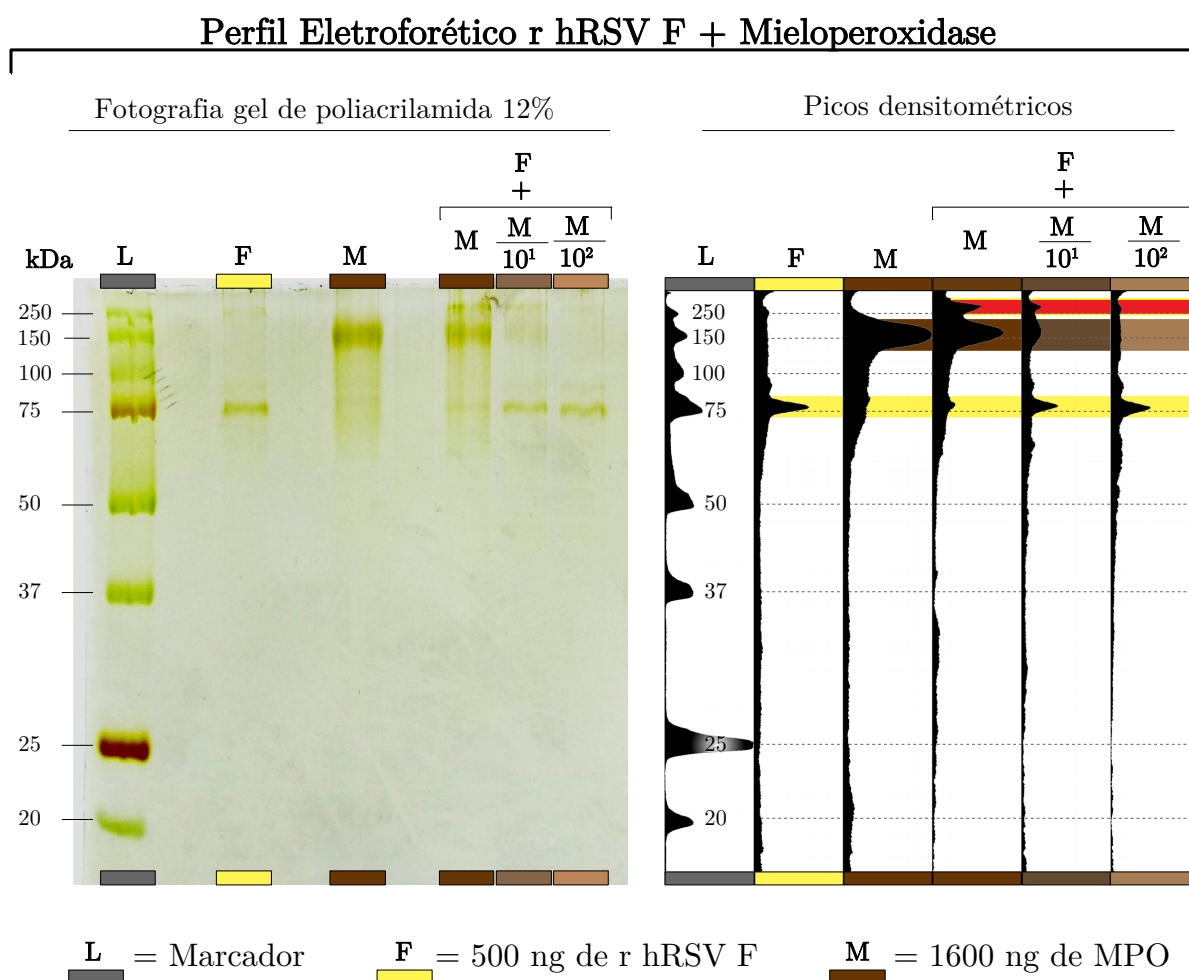


Figura 47 – Gel de poliacrilamida da Mieloperoxidase. A Mieloperoxidase foi pré-incubada por 2 horas com a r hRSV F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio, os picos das faixas foram identificados com auxílio da ferramenta “Gels” do software IMAGEJ. Fonte: o autor.

6.3.4.2 Eletroforese Proteinase 3

A próxima enzima a ser testada é a Proteinase 3, para tanto, 500 ng de r hRSV F foram incubado com diversas concentrações de Proteinase 3 (0,6–60ng) por 2 horas a 37 °C, em seguida o solução foi separada por eletroforese e o gel foi corado por nitrato de prata conforme descrito na seção 5.7.3.

Na Figura 48 estão representados a fotografia original do gel e ao lado o densitograma, a proteínas r hRSV F e Proteinase 3 foram aplicadas isoladamente nas primeiras faixas (F e P) e em combinação seguindo as concentrações representadas nas demais faixas.

Os controles exibiram o padrão de distribuição de bandas esperado. É possível identificar todos os picos do marcador (L) e uma banda intensa com ≈ 75 kDa na faixa com r hRSV F isolada (F) com boa amplitude e nitidez. Na faixa com Proteinase 3 isolada (P) o densitograma detectou apenas um disperso sinal que foi considerado artefato, visto que na fotografia original nota-se que o gel apresenta marcas de manipulação nesta mesma localização (Figura 48). O padrão de quantificação densitométrica destas regiões sofrem alterações quando as proteínas são co-incubadas.

Na faixa onde a r hRSV F foi incubada com a maior quantidade de Proteinase 3 (F+P), assim como o observado no ensaio anterior (Figura 47), uma banda de elevado peso molecular (≈ 250 kDa) foi detectada (Figura 48 destacado em vermelho, densitograma). Ainda nessa faixa, não foi possível identificar a banda referente a r hRSV F.

Nas faixas seguintes (com as menores quantidades de Proteinase 3) é possível identificar uma banda da r hRSV F com peso de ≈ 75 kDa. Na faixa onde a r hRSV F foi incubada com a menor concentração de Proteinase 3 (F+P/10²) a amplitude dessa banda (≈ 75 kDa) aumenta, inclusive é possível identificar o início de um novo pico com peso molecular menor (≈ 65 kDa). A intensidade da banda referente a r hRSV F aparenta ser inversamente proporcional a quantidade de Proteinase 3.

Inicialmente, o padrão das bandas desse ensaio se assemelham ao descrito no ensaio anterior (Figura 47), com formação de agregado no grupo incubado com maior quantidade de Proteinase 3 (F+P), entretanto, a amplitude dos picos

referente a h RSV F apresentam-se reduzidos quando em contato com a Proteínase 3, o que pode indicar clivagem de proteína F viral pela enzima Proteínase 3.

A Proteínase 3 apresentou efeito anti-hRSV em todos os ensaios conduzidos, restringindo a formação de sincícios e protegendo a monocamada de HEP-2 do efeito citopático decorrente da replicação viral. Até o momento, o conjunto de resultados indicam relevante efeito anti-hRSV da Proteínase 3 in vitro.

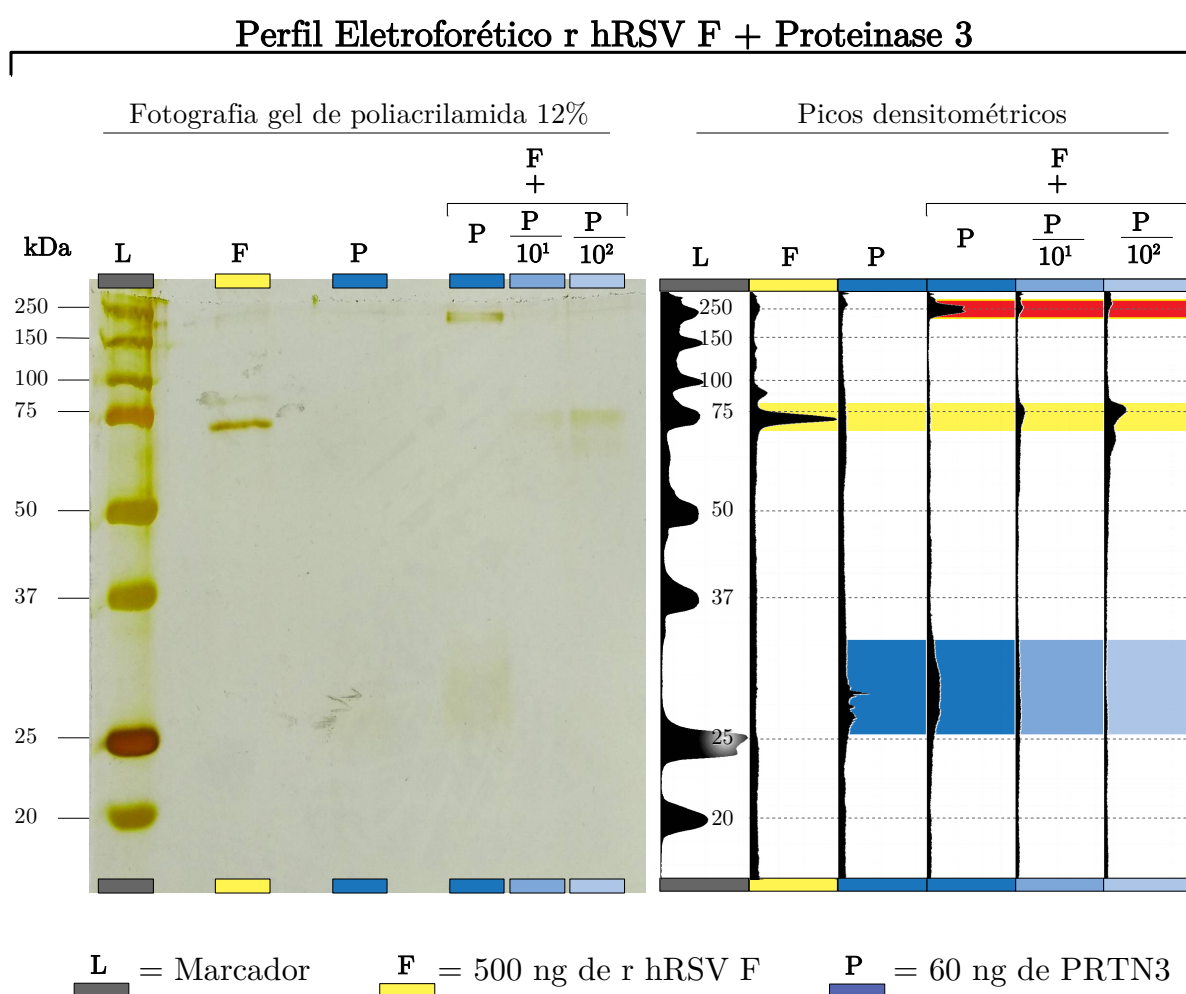


Figura 48 – Gel de poliacrilamida da Proteínase 3. A Proteínase 3 foi pré-incubada por 2 horas com a hRSV-F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio, as faixas foram quantificadas com auxílio da ferramenta “Gels” do software IMAGEJ. Fonte: o autor.

6.3.4.3 Eletroforese Catepsina G

A próxima enzima a ser testada é a Catepsina G, para tanto, 500 ng de r hRSV F foram incubado com diversas concentrações de Catepsina G (0,6–60 ng) por 2 horas a 37 °C, em seguida o solução foi separada por eletroforese e o gel foi corado por nitrato de prata conforme descrito na seção 5.7.3.

Na Figura 49 estão representados a fotografia original do gel e ao lado o densitograma, a proteínas r hRSV F e Catepsina G foram aplicadas isoladamente nas primeiras faixas (F e P) e em combinação seguindo as concentrações representadas nas demais faixas.

Os controles exibiram o padrão de distribuição de bandas esperado. É possível identificar todos os picos do marcador (L) e duas bandas com amplitude semelhante, uma com ≈ 75 kDa e outra com ≈ 250 kDa na faixa com r hRSV F isolada (F). Na faixa com Catepsina G isolada (C), assim como observado no ensaio anterior (Figura 48), a banda referente a essa proteína não foi detectada na fotografia e no densitograma (Figura 49).

Na faixa onde a hRSV F foi incubada com a maior quantidade de Catepsina G (F+C) é possível identificar somente uma banda com ≈ 75 kDa, a banda de ≈ 250 kDa presente na faixa de Catepsina G isolada (C) não foi identificada (Figura 49, F+C, densitograma).

Nas faixas consecutivas (com as menores quantidades de Catepsina G) é possível identificar duas bandas, uma de maior amplitude com peso de ≈ 75 kDa e outra com ≈ 250 kDa. Na faixa onde a r hRSV F foi incubada com a menor concentração de Catepsina G (F+C/10²) o padrão de bandas é semelhante ao apresentado pelo faixa (C), entretanto, a amplitude da banda com ≈ 250 kDa é menor (Figura 49, F+C/10², destacado em vermelho).

O padrão das bandas desse ensaio difere dos padrões apresentados pelos ensaios anteriores (Figura 47 e 48), não formando agregado no grupo incubado com maior quantidade de Catepsina G (F+C). Interessantemente, a intensidade dessa banda (≈ 250 kDa) aparenta ser inversamente proporcional a quantidade de Catepsina G, um comportamento nos leva a considerar que Catepsina G estaria clivando a h hRSV F.

Assim como a Proteinase 3, a Catepsina G apresentou relevante efeito anti-hRSV em todos os ensaios conduzidos, restringindo a formação de sincícios e protegendo a monocamada de HEp-2 do efeito citopático decorrente da replicação viral. Até o momento, o conjunto de resultados apresentados indicam relevante efeito anti-hRSV da Catepsina G *in vitro*.

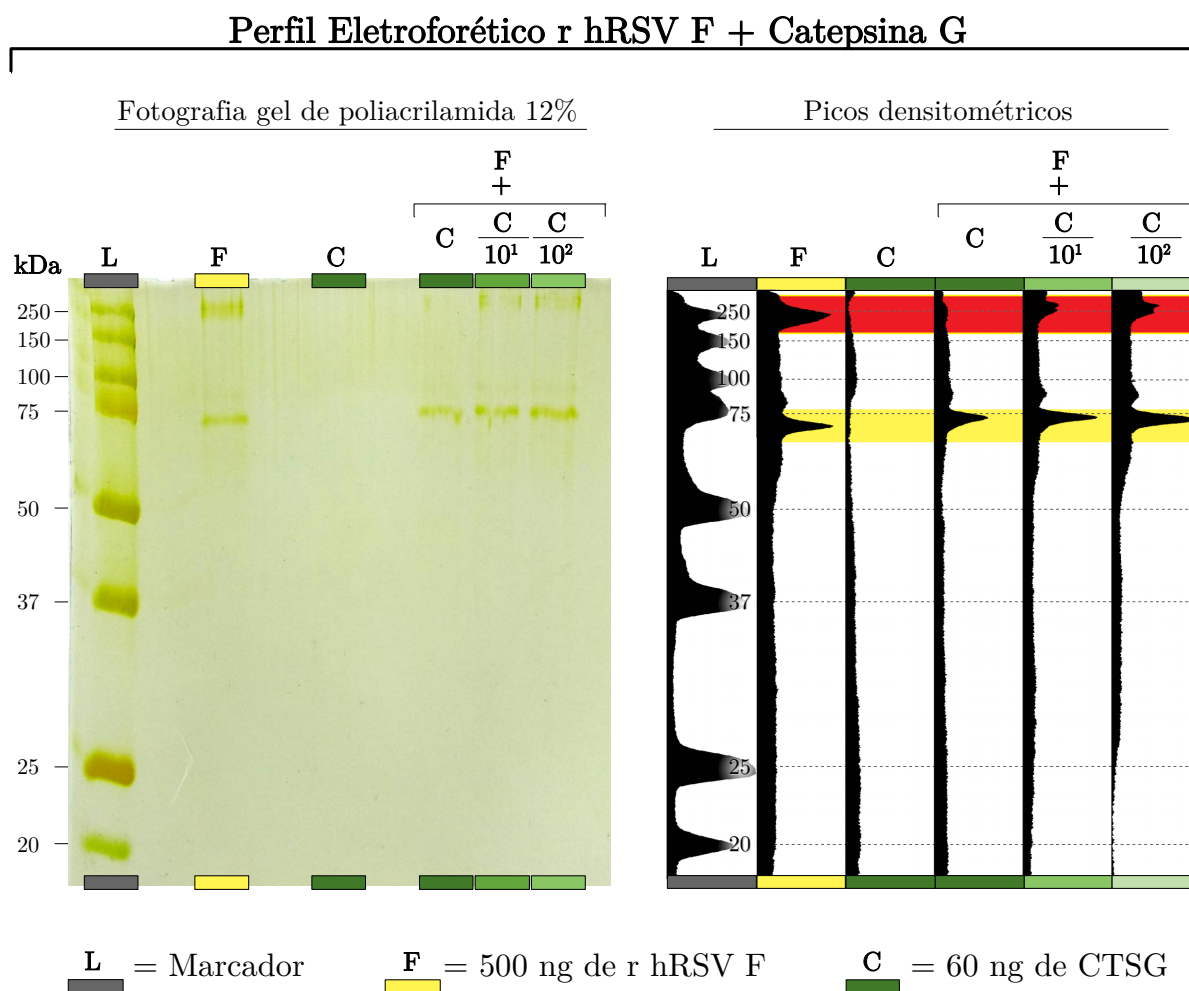


Figura 49 – Gel de poliacrilamida da Catepsina G. A Catepsina G foi pré-incubada por 2 horas com a hRSV-F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio, o perfil densitométrico das faixas foi realizado com auxílio da ferramenta “Gels” do software IMAGEJ. Fonte: o autor.

6.3.4.4 Eletroforese Elastase

A última enzima a ser testada foi a Elastase, para tanto, 500 ng de r hRSV F foram incubado com diversas concentrações de Elastase (12–1200 ng) e gel realizado conforme descrito na seção 5.7.3. Os controles se comportaram como o previsto, é possível identificar todos os picos do marcador (L) e duas bandas com amplitudes diferentes, uma com ≈ 70 kDa e outra com ≈ 150 kDa na faixa com r hRSV F isolada (F). Na faixa com Elastase isolada (E), as bandas características foram detectadas com boa nitidez e amplitude (Figura 50).

Nas faixas onde a r hRSV F foram incubadas com a Elastase não foi possível identificar a banda de ≈ 70 kDa referente a proteína F, sem alterar o sinal da banda de ≈ 150 kDa (Figura 50, densitograma, destacado em amarelo e vermelho). Ao mesmo tempo, a banda referente a Elastase em diferentes concentrações pôde ser observada em regiões próximas a 25 kDa (faixa em gradiente vermelho). Estes resultados nos indicam fortemente que a Elastase esteja interagindo e provavelmente clivando a r hRSV F.

Em conjunto, os dados de perfil eletroforético apresentados nessa seção mostram que as diferentes enzimas possuem algum efeito sobre a proteína F viral. Efeitos estes que poderiam impactar nas funções biológicas de tal proteína, dada sua importância no processo de infecção pelo hRSV.

O contato da proteína F com a Mieloperoxidase, aparentemente, favorece a formação de agregados sem sinal de clivagem (Figura 47). Nos ensaios *in vitro*, Mieloperoxidase foi aquela que apresentou os menores efeitos anti-hRSV, comparados aos efeitos das demais enzimas (Figura 41).

A Catepsina G e Elastase tiveram uma dinâmica anti-hRSV muito semelhante quando comparamos as curvas de proteção celular (Figura 43 e 44). Interessantemente, ambas também aparentaram possuir a capacidade de clivar a proteína viral F sem promover a formação de agregados (Figura 49 e 50). Vale ressaltar que este efeito enzimático ficou mais evidente no ensaio realizado com a Elastase. Por fim, o contato da proteína F com Proteínase 3, aquela que gerou os melhores efeitos anti-hRSV *in vitro*, incluindo manutenção da monocamada celular (Figura 27 e 42), resultou em clivagem da proteína F e aparente formação de agregados.

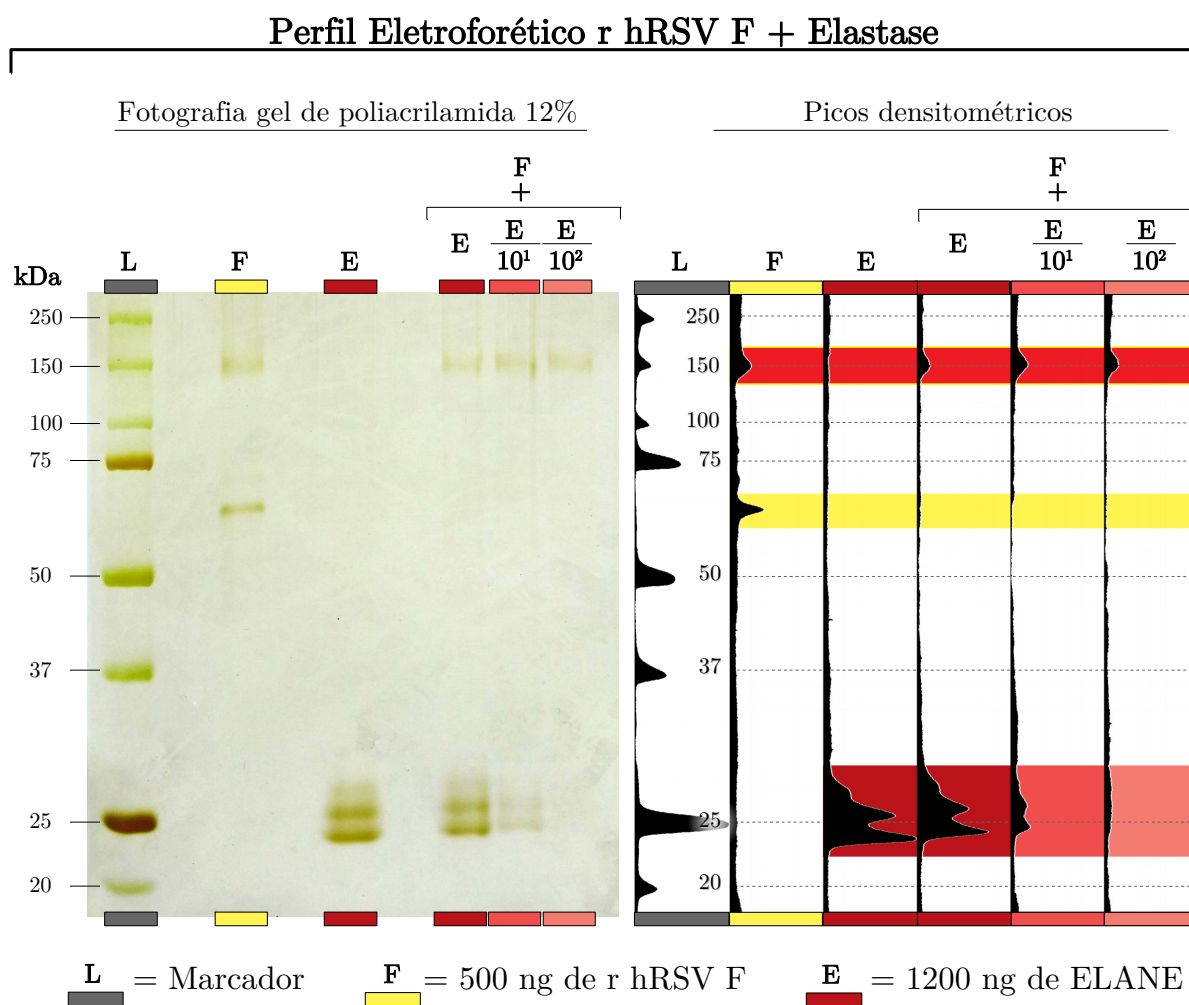


Figura 50 – Gel de poliacrilamida da Elastase. A Elastase foi pré-incubada por 2 horas com a hRSV-F, em seguida a solução foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% por 3 horas. Fonte: o autor.

As enzimas aqui testadas possuem características bioquímicas semelhantes, incluindo sítios de clivagem reconhecidos por elas. Uma busca rápida por tais sítios na sequência linear de aminoácidos da proteína F não revelou haver tais regiões nesta molécula. Dados preliminares utilizando análises de docking molecular também indicam interações favoráveis entre proteína F e as enzimas aqui estudadas.

Consideramos que, a confirmação e aprofundamento nestes dados são de suma importância para o entendimento dos efeitos das NETs sobre a infecção pelo hRSV. Assim, um novo lote de enzimas foi adquirido e novas parcerias foram estabelecidas.

6.3.5 Ensaio de Redução de Placas

O presente conjunto de dados indicam efeito direto das enzimas presentes nas NETs na replicação do hRSV. Intuindo caracterizar e confirmar o impacto dessa atividade, algumas enzimas foram avaliadas pelo clássico Ensaio de Redução de Placas de Lise, também conhecido como ensaio de Neutralização por Redução de Placas de Lise. Descrito originalmente por Félix d'Herelle em 1917 que, durante o cultivo de *Shigella dysenteriae*, reportou a formação de regiões circulares translúcidas onde não havia replicação bacteriana ("*taches vierges*")^[171]. Mais tarde esse conceito foi amplamente empregado na virologia e revolucionou o campo, possibilitando a quantificação viral de modo preciso e elegante^[117].

O ensaio de Placas de Lise consiste basicamente em concentrar a replicação viral utilizando um meio semi sólido para induzir a lise celular. Geralmente a monocamada é tingida para aumentar o contraste e revelar as regiões onde houve lise (placas), considera-se que cada placa decorre da replicação de uma única partícula viral. Área, forma e a definição das placas viriam de acordo com o tipo celular, densidade de plaqueamento, meio de cultivo, vírus, tempo de incubação etc. No caso do hRSV, a formação das placas de lise com nitidez e tamanho suficiente para visualização a olho nu pode ser uma tarefa desafiadora (Figura 51)^[7-9].

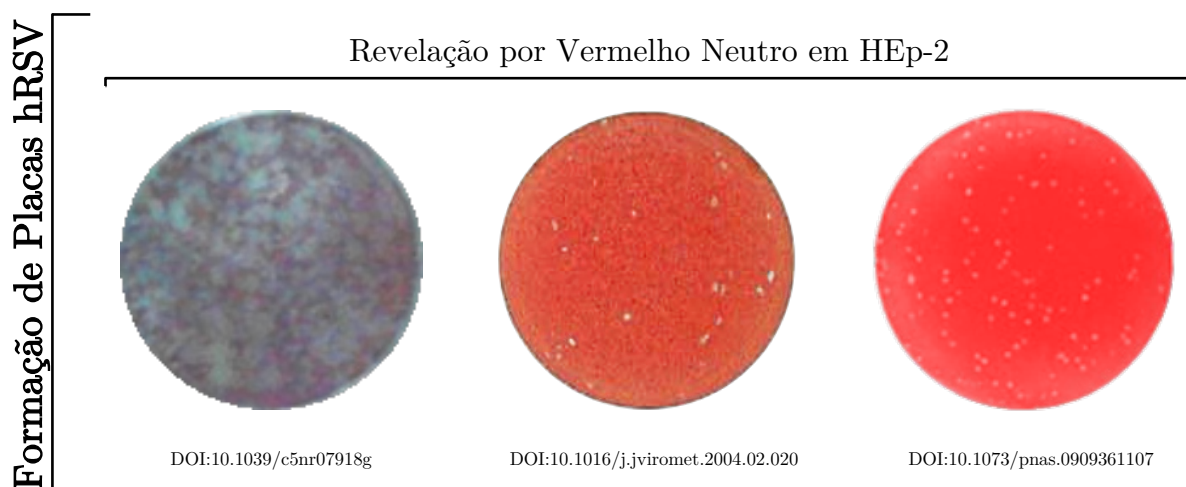


Figura 51 – Aspecto das placas de lise do hRSV. Fonte: adaptado de McKimm-Breschkin^[7] Yang, Li e Huang^[8] e Numataa et al.^[9].

Baseado nos resultados dos ensaios de Alterações Morfológicas a Pro-teinase 3, Catepsina G e Elastase — enzimas que reduziram a formação de sincícios — foram selecionadas para os ensaios confirmatórios de Redução de Placas conforme o descrito na seção 5.7.4. A contagem visual está representada pelos pontos pretos, em alguns casos, apenas uma fração da monocamada foi marcada, o valor total foi contado como demonstrado na Figura 52.

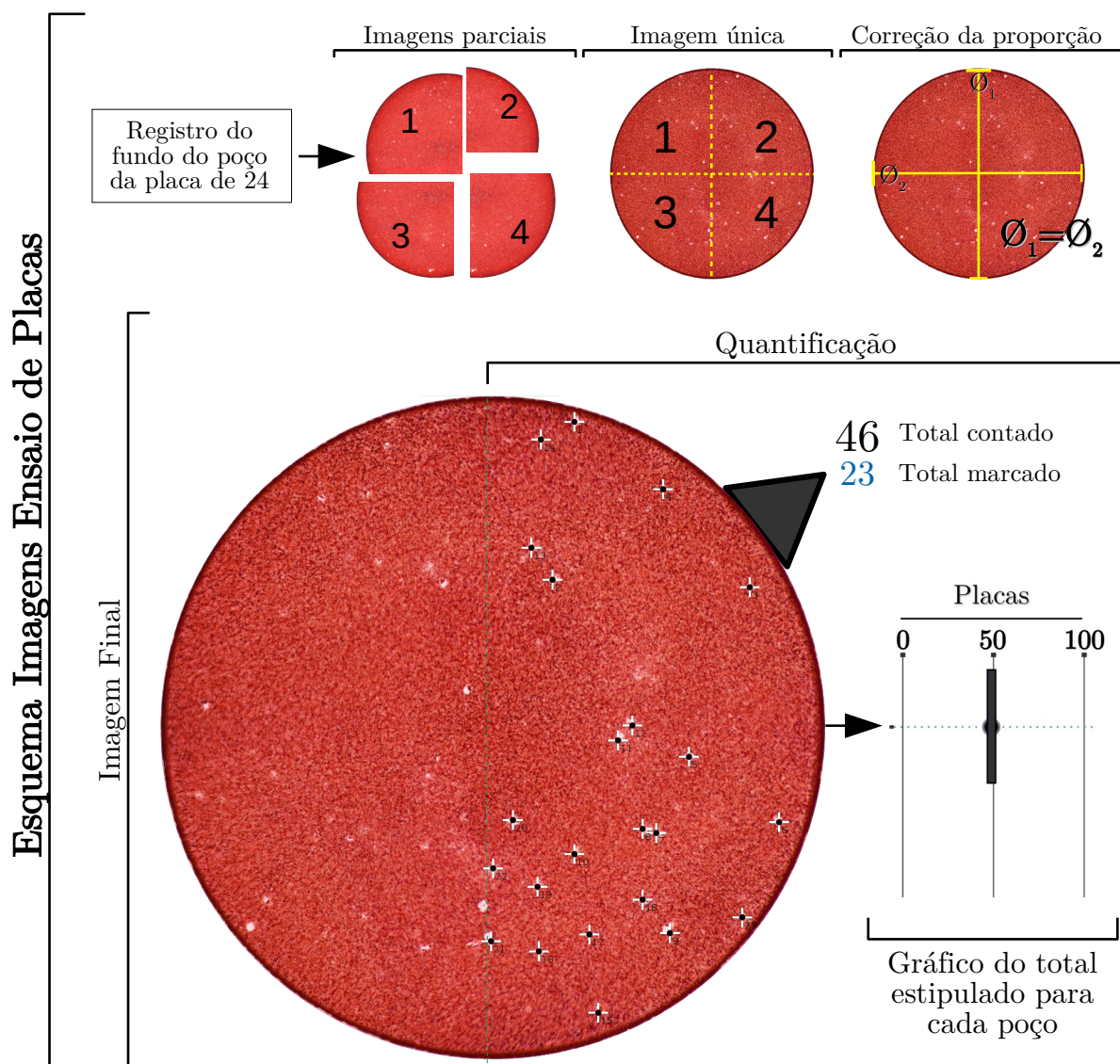


Figura 52 – Esquema de construção das imagens do ensaio de placa. As monocamadas de HEp-2 foram registradas via câmera digital acoplada em lupa, as fotos foram agrupadas de modo a formarem uma imagem única e contabilizadas com auxílio da ferramenta “Multi-point” do IMAGEJ. Fonte: o autor.

6.3.5.1 Redução de Placas: Proteinase 3

A visualização das placas de lise formadas durante a replicação do hRSV têm sido um problema relatado por diversos autores, em alguns casos, as placas podem ter pouca nitidez ou ser tão reduzidas a ponto da contagem só ser possível com auxílio de um microscópio ou lupa.^[71] Intuindo contornar esses problemas, aumentando a robustez dos ensaio de redução de placas formadas pelo hRSV, diversos reagentes de imunodeteção direcionados a de superfície foram desenvolvidos, entretanto, esses métodos possuem custo elevado e demandam equipamentos específicos, além disso, mutações nas proteínas virais podem levar a perda da reatividade, reduzindo o sinal e consequentemente a detecção dos focos^[172].

As placas formadas pela replicação do hRSV em nossas condições experimentais são visíveis a olho nu, entretanto, podem ser pequenas demais para a identificação na versão impressa dessa tese, então, a imagem original foi seccionada e ampliada para facilitar a visualização.

A atividade virucida da Proteinase 3 foi avaliada conforme o protocolo de Ensaio de Redução de Placas na faixa de 0,2–16 $\mu\text{mol/mL}$, a monocamada foi formalizada e corada com vermelho neutro para evidenciar os as placas de lise.

A redução na formação de placas de lise foi dose depende da concentração de Proteinase 3 (Apêndice F, 0,2-16 $\mu\text{mol/mL}$, $4 \cdot 10^6$ e $8 \cdot 10^6$ PFU/mL), as menores concentrações não apresentaram efeito virucida, com média de 448 placas (Figura 53, 0,2 e 1 $\mu\text{mol/mL}$). A concentração de 4 $\mu\text{mol/mL}$ apresentou redução relevante, com média de 192 (cerca de 55% se comparado com o CV), na maior concentração a redução foi excelente, com média de apenas 15 placas, ou seja, redução de cerca de 96% em relação ao CV (Figura 53, 16 $\mu\text{mol/mL}$).

Os resultados do Ensaio de Redução de Placas confirmam os achados de ensaio anteriores, evidente redução mas alterações morfológicas decorrentes da replicação do hRSV, com redução no tamanho médio e área total ocupada por sincícios (Figura 27 e 35). A redução na formação de placas de lise na ordem de 96% registrada na concentração de 16 $\mu\text{mol/mL}$ confirma os excelentes índices de Proteção Celular da Proteinase 3 (42, média de 94% de proteção em 8 e 16 $\mu\text{mol/mL}$).

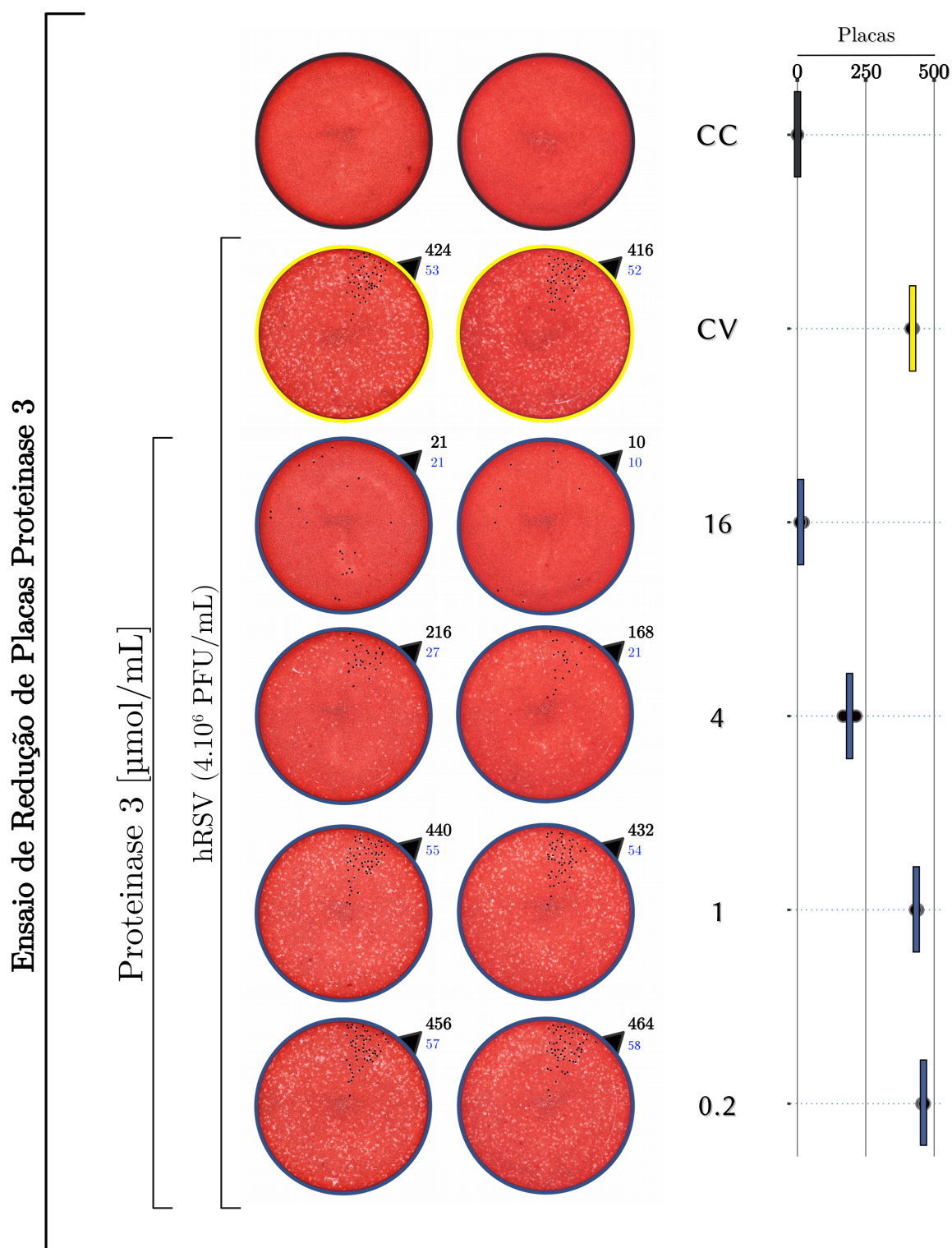


Figura 53 – Ensaio de redução de placa da Proteinase 3. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Proteinase 3 por duas horas. Após 5 dias as monocamadas foram formalizadas (formaldeído 3%) e coradas com solução de corante vermelho neutro (0,05%). Os dados do gráfico constam na Tabela 20. Fonte: o autor.

6.3.5.2 Redução de Placas: Catepsina G

Os ensaios de redução de placas de lise realizados nesse trabalho foram orientados pela metodologia descrita por Brinkmann et al., modificações e adequações realizadas estão descritas na seção 5.7.4. Outro fator extremamente influente na morfologia e tamanho das das placas de lise em células HEp-2 e a presença de agentes contaminantes como os micoplasmas^[7].

A contaminação de culturas de células por micoplasma são muito comuns e podem passar despercebidas por várias passagens, uma vez que sua replicação não altera o aspecto do meio de cultivo. Células HEp-2 contaminadas com micoplasma apresentam diversas alterações morfológicas características e são responsáveis por diversas alterações de metabolismo celular^[173]. Portanto, recomenda-se monitoramento constante e execução de protocolos de erradicação desses e outros contaminantes de células em cultura, principalmente se for realizar ensaios que dependam da correta morfologia celular como é o caso do ensaio de redução de placas de lise.

A atividade virucida da Catepsina G foi avaliada conforme o protocolo de Ensaio de Redução de Placas na faixa de 0,2–16 $\mu\text{mol/mL}$, a monocamada foi formalizada e corada com vermelho neutro para evidenciar os as placas de lise.

A redução na formação de placas de lise foi dose depende da concentração de Catepsina G (Apêndice G, 0,2-16 $\mu\text{mol/mL}$, $4 \cdot 10^6$ PFU/mL), menores concentrações não exerceram efeito virucida relevante, com média de 240 placas (Figura 54, 0,2 e 1 $\mu\text{mol/mL}$). Entretanto, nas maiores concentrações a redução foi notável, com média de 9 placas nas concentrações de 4 e 16 $\mu\text{mol/mL}$, redução de 98% em relação ao CV (Figura 54).

Esses resultados confirmam os achados de ensaio anteriores, evidente redução mas alterações morfológicas decorrentes da replicação do hRSV e redução em todos os índices de quantificação (Figura 28 e 34). Embora a CC50 da Catepsina G tenha sido estabelecida em 8,1 $\mu\text{mol/mL}$ no protocolo de viabilidade celular, a diluição realizada durante o protocolo do Ensaio de Redução de Placas (mínima de 1:100) certamente foi suficiente para proteger as HEp-2, mesmo na concentração de 16 $\mu\text{mol/mL}$ a monocamada permaneceu contígua (preservada) (Figura 54).

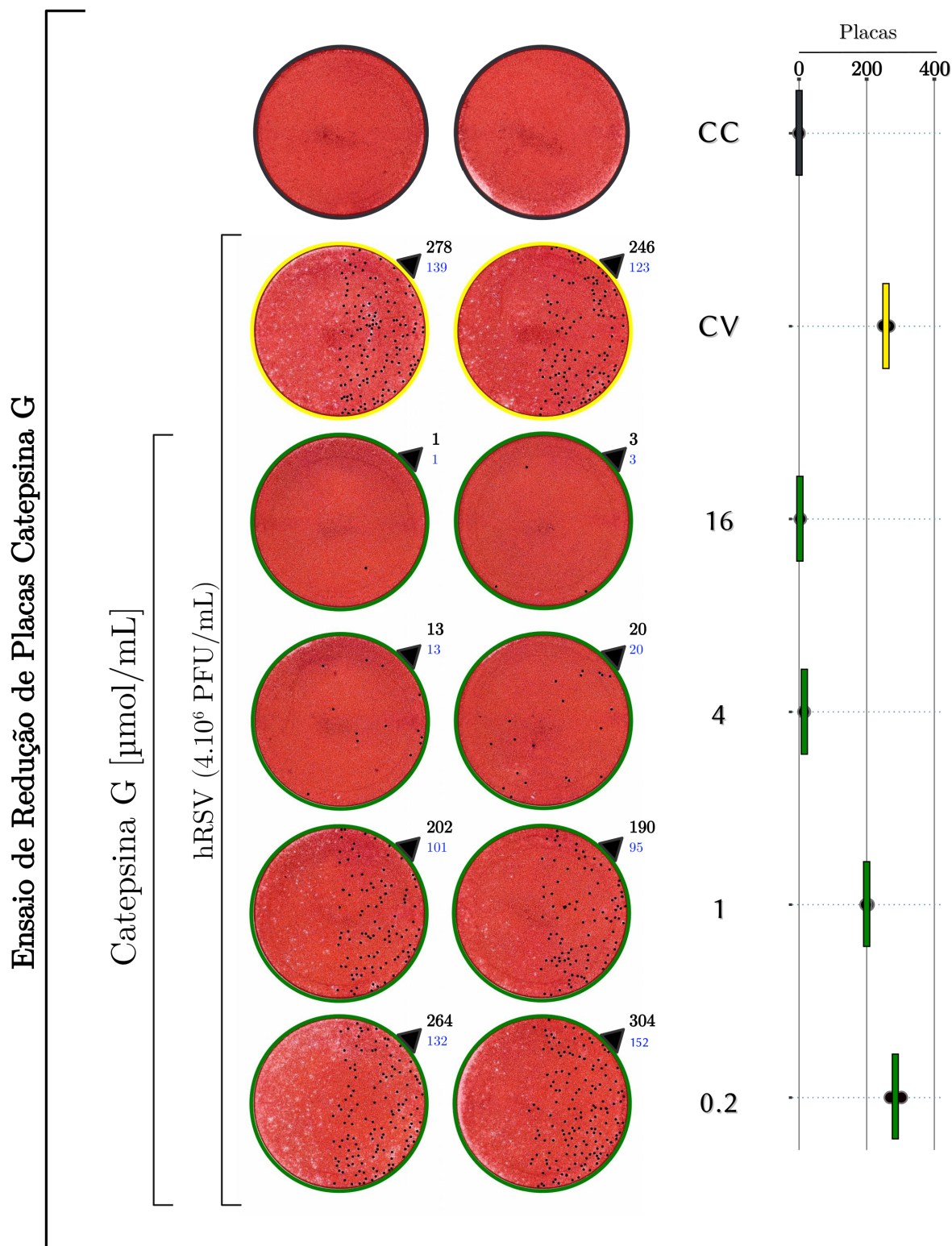


Figura 54 – Ensaio de redução de placa da Catepsina G. Monocamadas confluentes de HEp-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Catepsina G por duas horas. Após 5 dias as monocamadas foram formalizadas (formaldeído 3%) e coradas com solução de corante vermelho neutro (0,05%). Os dados do gráfico constam na Tabela 21. Fonte: o autor.

6.3.5.3 Redução de Placas: Elastase

A atividade virucida da Elastase foi avaliada conforme o protocolo de Ensaio de Redução de Placas na faixa de 0,2–16 $\mu\text{mol/mL}$, a monocamada foi formalizada e corada com vermelho neutro para evidenciar os as placas de lise.

A Elastase reduziu a formação de placas de lise de modo dose depende nas condições testadas (Apêndice F, 0,2-16 $\mu\text{mol/mL}$, $4 \cdot 10^5$ e $4 \cdot 10^6$ PFU/mL), menores concentrações não exerceram efeito virucida relevante, com média de 260 placas (Figura 55, 0,2 e 1 $\mu\text{mol/mL}$). Entretanto, nas maiores concentrações a redução foi notável, com média de 30 placas nas concentrações de 4 e 16 $\mu\text{mol/mL}$, redução de 90% em relação ao CV (Figura 55).

Esses resultados corroboram os achados anteriores, evidente redução mas alterações morfológicas decorrentes da replicação do hRSV, redução no número de sincícios e área relativa (Figura 29 e 35). Assim, como no caso da Catepsina G, a diluição executada no protocolo de Ensaio de Redução de Placas foi suficiente para extinguir os efeitos citotóxicos descritos no Ensaio de Viabilidade (Figura 55)

Os resultados expostos nessa seção, confirmam os achados apresentados nas seções anteriores, caracterizando um evidente e consistente efeito anti-hRSV in vitro das serino proteases presentes nas NETs.

As enzimas Proteinase 3, Catepsina G e Elastase, foram capazes de reduzir as alterações morfológicas decorrentes da replicação do hRSV (formação de sincícios) em diversas concentrações. Além disso, foi possível calcular dois índices de proteção celular baseados em ensaio de viabilidade.

O perfil eletroforético dos ensaios envolvendo as proteínas das NETs e a proteína de fusão viral F, embora necessitem de maior aprofundamento, são promissores, indicando uma possível interação direta dessas enzimas sobre a proteína de fusão F do hRSV, provavelmente via clivagem.

O levantamento de dados referentes as particularidades e especificidades de substratos para cada uma dessas enzimas já estão em andamento, ensaios in silico serão conduzidos para explorar as possíveis interações e/ou os prováveis sítios envolvidos na atividade anti-hRSV aqui descrita.

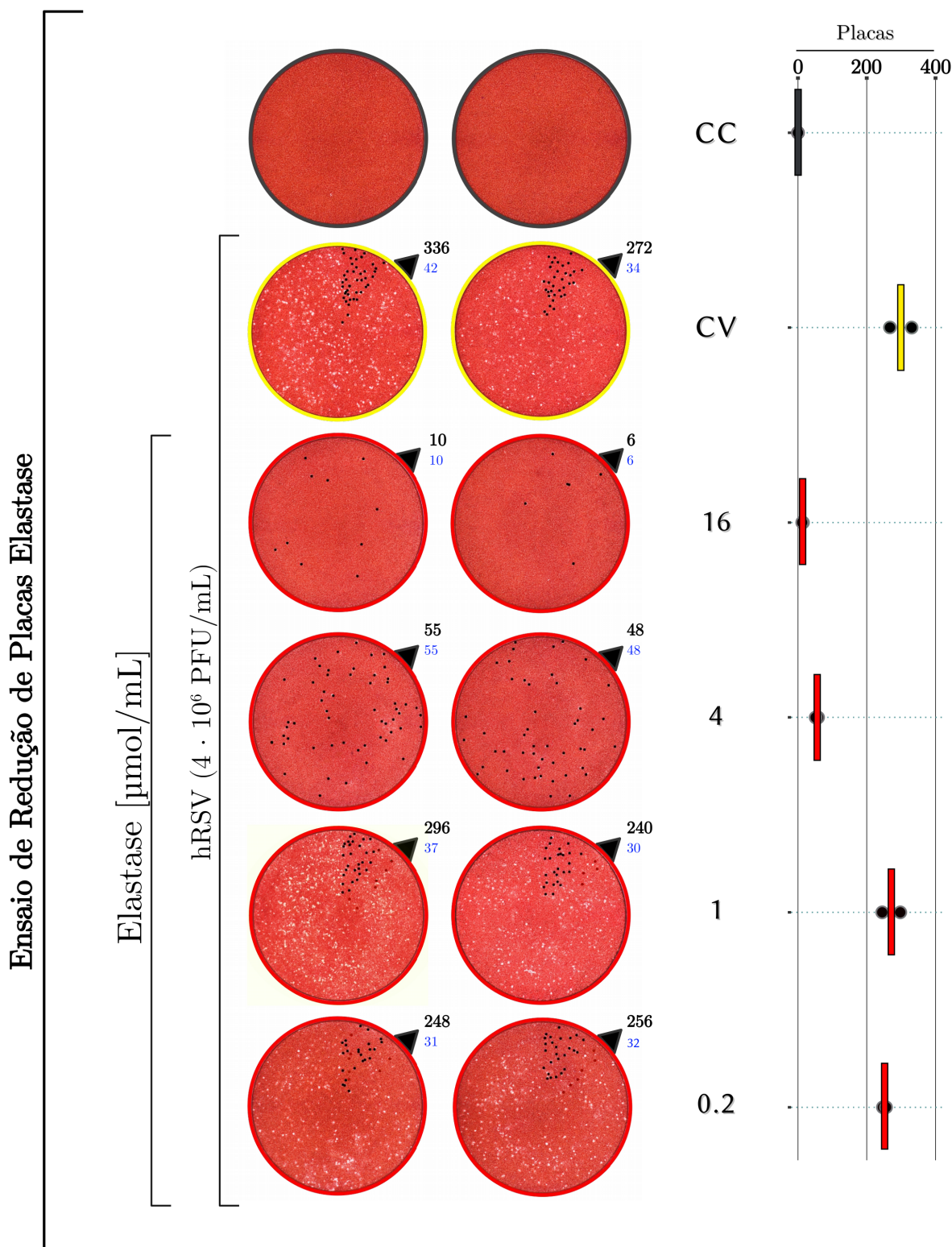


Figura 55 – Ensaio de redução de placa da Elastase. Monocamadas confluentes de HEP-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Elastase por duas horas. Após 5 dias as monocamadas foram formalizadas (formaldeído 3%) e coradas com solução de corante vermelho neutro (0,05%). Os dados do gráfico constam na Tabela 22. Fonte: o autor.

7 Resumo dos Resultados

- A Mieloperoxidase e Proteinase 3 não apresentaram efeito citotóxico. A Catepsina G e Elastase foram citotóxicas em algumas condições:
 - Catepsina G (CC50 = 8,1 $\mu\text{mol/mL}$)
 - Elastase (CC50 = 12,1 $\mu\text{mol/mL}$)
- A Mieloperoxidase e Proteinase 3 não alteraram o aspecto da monocamada de HEp-2. A Catepsina G e Elastase induziram desafixação e/ou aglomeração:
 - Catepsina G (perceptível a partir de 8 $\mu\text{mol/mL}$)
 - Elastase (perceptível a partir de 16 $\mu\text{mol/mL}$)
- A Proteinase 3, Catepsina G e Elastase protegeram as monocamadas da replicação do hRSV, foram estabelecidos índices de proteção celular (CP50 e CE50):
 - Proteinase 3 (CP50 = 2,5 $\mu\text{mol/mL}$; CE50 = 2,6 $\mu\text{mol/mL}$)
 - Catepsina G (CP50 = 0,6 $\mu\text{mol/mL}$; CE50 = 1,2 $\mu\text{mol/mL}$)
 - Elastase (CP50 = 1,4 $\mu\text{mol/mL}$; CE50 = 2,2 $\mu\text{mol/mL}$)
- O perfil eletroforético sugere que as enzimas interagem e/ou clivam a proteína F viral.
- A exposição do hRSV às enzimas reduz a formação de placas de lise:
 - Proteinase 3 (redução em 4–16 $\mu\text{mol/mL}$)
 - Catepsina G (redução em 1–16 $\mu\text{mol/mL}$)
 - Elastase (redução em 4–16 $\mu\text{mol/mL}$)

Tabela 2 – Resumo dos resultados dos ensaios realizados com as enzimas das NETs. Destacado em amarelo as condições consideradas nesse trabalho como relevantes para caracterizar a ação direta destas enzimas sobre o vírion do hRSV. Fonte: o autor.

		Ensaio Colorimétrico via MTT								Enzima	
		$\mu\text{mol/mL}$									
		0,1	0,2	0,5	1	2	4	8	16	32	
Viabilidade da monocamada (%)				91	85	83	83	82	86	91	mpo
		90	81	77	76	72	71	73	71		prtn
		91	79	77	74	73	67	43	34		ctsg
			95	83	79	75	76	72	30	3	elas
Red. na formação de sincícios (%)			-6	11	12	14	-2	-5	29	30	mpo
	16	17	40	14	31	51	45	61			prtn
	7	-4	18	30	57	89	99	100			ctsg
			12	-7	25	-7	63	100	99	94	
Índice de Proteção Celular (%)			3	4	3	7	11	16	23	31	mpo
	-4	-3	0	3	53	63	87	101			prtn
	4	4	22	55	60	64	56	34			ctsg
			5	8	14	37	94	62	54	31	

Eletrforese em Gel de Poliacrilamida

		Faixa			Enzima
		3	2	1	
Interação com a proteína de fusão F		M/100	M/10	M	mpo
		P/100	P/10	P	prtn
		C/100	C/10	C	ctsg
		E/100	E/10	E	elas

Ensaio de Redução de Placas de Lise

		$\mu\text{mol/mL}$				Enzima
		0,2	1	4	16	
Redução de PFU (%)		-5	3	54	95	prtn
		-8	28	94	99	ctsg
		1	32	86	86	elas

8 Conclusão

Nesse trabalho demonstramos que enzimas provenientes das NETs possuem atividade anti-hRSV *in vitro*. As infecções do trato respiratório são um grave problema de saúde pública mundial, resultando em milhões de casos graves de bronquiolite anualmente, sendo o hRSV o principal agente etiológico das infecções respiratórias agudas do trato inferior. O hRSV promove o influxo de células imunes, populando o tecido predominantemente com leucócitos polimorfonucleares cuja (neutrófilos), células versáteis, com intensa atividade microbicida e imunomodulatória. No contexto da inflamação causada pelo hRSV, os neutrófilos produzem NETs, estruturas compostas principalmente por DNA e enzimas granulares. Embora a capacidade anti-hRSV das NETs seja ainda pouco conhecida, é certo que a secreção ou acúmulo dessas estruturas nos tecidos causa danos e compromete a fisiologia pulmonar. O aprofundamento desse e de outros estudos envolvendo as NETs e suas enzimas, certamente contribuirão na elucidação do papel dessas estruturas no contexto inflamatório, principalmente nas infecções agudas do trato respiratório inferior de etiologia viral.

Referências

- 1 BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004. ISSN 00368075. Citado 3 vezes nas páginas 8, 40 e 42.
- 2 BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 8, p. 577–582, 2007. ISSN 17401526. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 40.
- 3 BURGNER, S. S.; SCHRODER, K. Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2020. ISSN 19430264. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 41.
- 4 HUONG, T. N. et al. Evidence for a biphasic mode of respiratory syncytial virus transmission in permissive HEP2 cell monolayers. *Virology Journal*, v. 13, n. 1, p. 12, dec 2016. ISSN 1743-422X. Disponível em: <<http://www.virologyj.com/content/13/1/12>>. Citado 6 vezes nas páginas 12, 73, 74, 75, 76 e 77.
- 5 BITKO, V. et al. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiology*, 2003. ISSN 14712180. Citado 5 vezes nas páginas 12, 74, 75, 76 e 77.
- 6 TIAN, J. et al. RAGE inhibits human respiratory syncytial virus syncytium formation by interfering with F-protein function. *Journal of General Virology*, v. 94, n. 8, p. 1691–1700, aug 2013. ISSN 0022-1317. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.049254-0>>. Citado 5 vezes nas páginas 12, 74, 75, 76 e 77.
- 7 MCKIMM-BRESCHKIN, J. L. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining. *Journal of Virological Methods*, v. 120, n. 1, p. 113–117, sep 2004. ISSN 01660934. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093404001211>>. Citado 5 vezes nas páginas 18, 51, 125, 127 e 129.
- 8 YANG, X. X.; LI, C. M.; HUANG, C. Z. Curcumin modified silver nanoparticles for highly efficient inhibition of respiratory syncytial virus infection. *Nanoscale*, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 5, p. 3040–3048, 2016. ISSN 20403372. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 125.

- 9 NUMATAA, M. et al. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 1, p. 320–325, 2010. ISSN 00278424. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 125.
- 10 PETRETTO, A. et al. Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS ONE*, v. 14, n. 7, p. 1–18, 2019. ISSN 19326203. Citado 4 vezes nas páginas 21, 41, 42 e 43.
- 11 BORCHERS, A. T. et al. Respiratory syncytial virus - A comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, v. 45, n. 3, p. 331–379, 2013. ISSN 10800549. Citado na página 30.
- 12 TANAKA, O. M. et al. Nailbiting, or onychophagia: A special habit. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 134, n. 2, p. 305–308, 2008. ISSN 08895406. Citado na página 30.
- 13 JAFRI, H. S. et al. Distribution of respiratory syncytial virus subtypes A and B among infants presenting to the emergency department with lower respiratory tract infection or apnea. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 32, n. 4, p. 335–40, 2013. ISSN 1532-0987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337904>>. Citado na página 30.
- 14 PAPADOPOULOS, N. G. et al. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respiratory Medicine*, v. 98, n. 9, p. 879–882, 2004. ISSN 09546111. Citado na página 30.
- 15 STRENG, A. et al. Spread and clinical severity of respiratory syncytial virus A genotype ON1 in Germany, 2011-2017. *BMC Infectious Diseases*, BMC Infectious Diseases, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019. ISSN 14712334. Citado na página 30.
- 16 CHADHA, M. et al. Human respiratory syncytial virus and influenza seasonality patterns—Early findings from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance. *Influenza and other Respiratory Viruses*, n. January, p. 638–646, 2020. ISSN 17502659. Citado na página 30.
- 17 TROEGER, C. et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 11, p. 1191–1210, nov 2018. ISSN 14733099. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303104>>. Citado na página 30.

- 18 MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 92, n. 3, p. 544–549, 1956. ISSN 15353699. Citado na página 31.
- 19 CHANOCK, R.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): Isolation, properties and characterization. *American Journal of Epidemiology*, v. 66, n. 3, p. 281–290, 1957. ISSN 00029262. Citado na página 31.
- 20 GOODPASTURE, E. W. et al. VIRUS PNEUMONIA OF INFANTS SECONDARY TO EPIDEMIC INFECTIONS. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, v. 57, n. 5, p. 997–1011, may 1939. ISSN 1072-4710. Disponível em: <<http://archpedi.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/archpedi.1939.01990050003001>>. Citado na página 31.
- 21 FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. *Respiratory syncytial virus infection in adults*. 2000. Citado na página 32.
- 22 COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of Virology*, v. 82, n. 5, p. 2040–2055, 2008. ISSN 0022-538X. Citado 3 vezes nas páginas 32, 35 e 36.
- 23 DUPUY, L. C. et al. Casein Kinase 2-Mediated Phosphorylation of Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein P Is Essential for the Transcription Elongation Activity of the Viral Polymerase; Phosphorylation by Casein Kinase 1 Occurs Mainly at Ser215 and Is without Effect. *Journal of Virology*, v. 73, n. 10, p. 8384–8392, 1999. ISSN 0022-538X. Citado na página 32.
- 24 LENARD, J. Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: All in a family? *Virology*, v. 216, n. 2, p. 289–298, 1996. ISSN 00426822. Citado na página 33.
- 25 SHAHRIARI, S.; WEI, K. J.; GHILDYAL, R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin in vitro and in cell culture. *Viruses*, v. 10, n. 10, p. 7–12, 2018. ISSN 19994915. Citado na página 33.
- 26 TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M. E. Functional Analysis of Recombinant Respiratory Syncytial Virus Deletion Mutants Lacking the Small Hydrophobic and/or Attachment Glycoprotein Gene. *Journal of Virology*, v. 75, n. 15, p. 6825–6834, 2001. ISSN 0022-538X. Citado na página 33.

- 27 COLLINS, P. L.; MOTTET, G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, v. 74, n. 7, p. 1445–1450, 1993. ISSN 00221317. Citado na página 33.
- 28 NORRBY, E.; MUFSON, M. A.; SHESHERADARAN, H. Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, v. 67, n. 12, p. 2721–2729, 1986. ISSN 00221317. Citado na página 33.
- 29 JOHNSON, P. R. et al. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 16, p. 5625–5629, 1987. ISSN 00278424. Citado na página 33.
- 30 WALSH, E. E.; HRUSKA, J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *Journal of Virology*, v. 47, n. 1, p. 171–177, 1983. ISSN 0022-538X. Citado na página 33.
- 31 TAYYARI, F. et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, Nature Publishing Group, v. 17, n. 9, p. 1132–1135, 2011. ISSN 10788956. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2444>>. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 36.
- 32 MELERO, J. A.; MAS, V. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus Research*, Elsevier B.V., v. 209, p. 128–135, 2015. ISSN 18727492. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.024>>. Citado na página 33.
- 33 BUKREYEV, A. et al. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *Journal of virology*, v. 71, n. 12, p. 8973–8982, 1997. ISSN 0022-538X. Citado na página 33.
- 34 KARRON, R. A. et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 25, p. 13961–13966, 1997. ISSN 00278424. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 44.

- 35 JIN, H. et al. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology*, v. 273, n. 1, p. 210–218, 2000. ISSN 00426822. Citado na página 33.
- 36 COLLINS, P. L. et al. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 1, p. 81–85, 1996. ISSN 00278424. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 37.
- 37 TRAN, T.-L. et al. The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. *Journal of Virology*, v. 83, n. 13, p. 6363–6374, 2009. ISSN 0022-538X. Citado na página 35.
- 38 CARTEE, T. L.; WERTZ, G. W. Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection. *Journal of Virology*, v. 75, n. 24, p. 12188–12197, 2001. ISSN 0022-538X. Citado na página 35.
- 39 CHENG, X. et al. Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. *Journal of Virology*, v. 79, n. 22, p. 13943–13952, nov 2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.22.13943-13952.2005>>. Citado na página 35.
- 40 TIONG-YIP, C. L. et al. Characterization of a respiratory syncytial virus L protein inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 3867–3873, 2014. ISSN 10986596. Citado na página 35.
- 41 STEC, D. S.; HILL, M. G.; COLLINS, P. L. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology*, v. 183, n. 1, p. 273–287, 1991. ISSN 10960341. Citado na página 35.
- 42 MORIN, B. et al. *The polymerase of negative-stranded RNA viruses*. 2013. Citado na página 35.
- 43 TIWARI, P. M. et al. Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in HEp-2 cells. *Journal of Microscopy*, 2014. ISSN 00222720. Citado na página 35.
- 44 BEHERA, A. K. et al. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 280, n. 1, p. 188–195, 2001. ISSN 0006291X. Citado na página 36.

- 45 TENG, M. N.; WHITEHEAD, S. S.; COLLINS, P. L. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*, v. 289, n. 2, p. 283–296, 2001. ISSN 00426822. Citado na página 36.
- 46 LO, M. S.; BRAZAS, R. M.; HOLTZMAN, M. J. Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha/Beta Interferon Responsiveness. *Journal of Virology*, v. 79, n. 14, p. 9315–9319, 2005. ISSN 0022-538X. Citado na página 37.
- 47 BÄCHI, T.; HOWE, C. Morphogenesis and Ultrastructure of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, v. 12, n. 5, p. 1173–1180, 1973. ISSN 0022-538X. Citado na página 37.
- 48 DOMACHOWSKE, J. B.; ROSENBERG, H. F. Respiratory syncytial virus infection: Immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 2, p. 298–309, 1999. ISSN 08938512. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 38.
- 49 BENNETT, B. L. et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 195, n. 10, p. 1532–1540, 2007. ISSN 00221899. Citado na página 37.
- 50 RZEPKA, J. P.; HAICK, A. K.; MIURA, T. A. Virus-infected alveolar epithelial cells direct neutrophil chemotaxis and inhibit their apoptosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 46, n. 6, p. 833–841, 2012. ISSN 10441549. Citado na página 37.
- 51 RAJAN, D. et al. Response to Rhinovirus Infection by Human Airway Epithelial Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells in an In Vitro Two-Chamber Tissue Culture System. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. 2–8, 2013. ISSN 19326203. Citado na página 38.
- 52 MCNAMARA, P. S. et al. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Archives of Disease in Childhood*, v. 88, n. 10, p. 922–926, 2003. ISSN 00039888. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 44.
- 53 HORNSLETH, A.; LOLAND, L.; LARSEN, L. B. Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Journal of Clinical Virology*, v. 21, n. 2, p. 163–170, 2001. ISSN 13866532. Citado na página 38.

- 54 KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, Nature Publishing Group, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. ISSN 14741733. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>>. Citado 3 vezes nas páginas 38, 39 e 44.
- 55 NAUMENKO, V. et al. Neutrophils in viral infection. *Cell and Tissue Research*, 2018. Citado na página 39.
- 56 ROSALES, C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. FEB, p. 1–17, 2018. ISSN 1664042X. Citado na página 39.
- 57 BROWN, P. M.; SCHNEEBERGER, D. L.; PIEDIMONTE, G. Biomarkers of respiratory syncytial virus (RSV) infection: Specific neutrophil and cytokine levels provide increased accuracy in predicting disease severity. *Paediatric Respiratory Reviews*, Elsevier Ltd, v. 16, n. 4, p. 232–240, 2015. ISSN 15260550. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.005>>. Citado na página 39.
- 58 FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007. ISSN 00219525. Citado na página 40.
- 59 SOLLBERGER, G. et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science Immunology*, v. 3, n. 26, 2018. ISSN 24709468. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 43.
- 60 BRANITZKI-HEINEMANN, K. et al. Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. NOV, p. 1–9, 2016. ISSN 16643224. Citado na página 41.
- 61 SOUSA-ROCHA, D. et al. Trypanosoma cruzi and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2015. ISSN 19326203. Citado na página 42.
- 62 YU, X.; TAN, J.; DIAMOND, S. L. Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, nov 2017. ISSN 15387933. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29156107http://doi.wiley.com/10.1111/jth.13907>>. Citado na página 42.
- 63 KAMOSHIDA, G. et al. Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps in serum-free culture conditions. *FEBS Open Bio*, v. 7, n. 6, p. 877–886, 2017. ISSN 22115463. Citado na página 42.

- 64 SOUZA, P. S. S. et al. Neutrophil extracellular traps possess anti-human respiratory syncytial virus activity: Possible interaction with the viral F protein. *Virus Research*, v. 251, p. 68–77, jun 2018. ISSN 01681702. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170217304999>>. Citado na página 42.
- 65 Marin Oyarzún, C. P. et al. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, v. 6, n. November, p. 1–13, 2016. ISSN 20452322. Citado na página 42.
- 66 CASSATELLA, M. A. et al. *Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines*. 2019. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 113.
- 67 METZLER, K. D. et al. Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, The Authors, v. 8, n. 3, p. 883–896, 2014. ISSN 22111247. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>>. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 113.
- 68 PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, v. 191, n. 3, p. 677–691, nov 2010. ISSN 1540-8140. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/191/3/677/36051/Neutrophil-elastase-and-myeloperoxidase-regulate>>. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 113.
- 69 NICHOLSON, E. G.; MUNOZ, F. M. A Review of Therapeutics in Clinical Development for Respiratory Syncytial Virus and Influenza in Children. *Clinical Therapeutics*, Elsevier Inc., v. 40, n. 8, p. 1268–1281, 2018. ISSN 1879114X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.06.014>>. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 106.
- 70 GARCIA-ROMO, G. S. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, v. 3, n. 73, 2011. ISSN 19466234. Citado na página 44.
- 71 FUNCHAL, G. A. et al. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4–Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. *PLOS ONE*, v. 10, n. 4, p. e0124082, apr 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124082>>. Citado na página 44.

- 72 EMBORIADOU, M. et al. Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, v. 37, n. 1, p. 79–84, 2007. ISSN 00917370. Citado na página 44.
- 73 DRYSDALE, S. B.; GREEN, C. A.; SANDE, C. J. Best practice in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 3, n. 2, p. 63–71, 2016. ISSN 2049-9361. Citado na página 44.
- 74 CHOI, Y. et al. Antibodies to the central conserved region of respiratory syncytial virus (RSV) G protein block RSV G protein CX3C-CX3CR1 binding and cross-neutralize RSV A and B strains. *Viral Immunology*, v. 25, n. 3, p. 193–203, 2012. ISSN 08828245. Citado na página 44.
- 75 JORQUERA, P. A. et al. Layer-by-layer nanoparticle vaccines carrying the G protein CX3C motif protect against RSV infection and disease. *Vaccines*, v. 3, n. 4, p. 829–849, 2015. ISSN 2076393X. Citado na página 44.
- 76 WELLIVER, R. C.; WILLISON, D. F.; SCOTT, C. A. *Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection*. 2003. Citado na página 45.
- 77 FROGEL, M. P. et al. A systematic review of compliance with palivizumab administration for RSV immunoprophylaxis. *Journal of Managed Care Pharmacy*, v. 16, n. 1, p. 46–58, 2010. ISSN 10834087. Citado na página 45.
- 78 YOUNG, J. Development of a potent respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody for the prevention of serious lower respiratory tract disease in infants. *Respiratory Medicine*, 2002. ISSN 09546111. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 63.
- 79 MAC, S. et al. Cost-effectiveness of Palivizumab for Respiratory Syncytial Virus: A systematic review. *Pediatrics*, v. 143, n. 5, 2019. ISSN 10984275. Citado na página 45.
- 80 SNELL, N. J. Ribavirin - Current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2001. ISSN 14656566. Citado 4 vezes nas páginas 45, 61, 62 e 103.
- 81 VENTRE, K.; RANDOLPH, A. G. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 1, 2007. ISSN 1469493X. Citado na página 45.

- 82 MAZUR, N. I. et al. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 10, p. e295–e311, 2018. ISSN 14744457. Citado na página 45.
- 83 SUN, Z. et al. Respiratory syncytial virus entry inhibitors targeting the F protein. *Viruses*, v. 5, n. 1, p. 211–225, 2013. ISSN 19994915. Citado na página 45.
- 84 LOPES, B. R. P. et al. Quercetin pentaacetate inhibits in vitro human respiratory syncytial virus adhesion. *Virus Research*, v. 276, p. 197805, jan 2020. ISSN 01681702. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170219303533>>. Citado na página 45.
- 85 ENRIQUEZ, A. et al. Nebulised deoxyribonuclease for viral bronchiolitis in children younger than 24 months. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012. ISSN 1469-493X. Citado na página 45.
- 86 CORTJENS, B. et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *Journal of Pathology*, v. 238, n. 3, p. 401–411, 2016. ISSN 10969896. Citado na página 45.
- 87 SHIGETA, S. et al. The Cell to Cell Infection of Respiratory Syncytial Virus in HEp-2 Monolayer Cultures. *Journal of General Virology*, v. 3, n. 1, p. 129–131, jul 1968. ISSN 0022-1317. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-3-1-129>>. Citado na página 50.
- 88 ANDERSON, L. J. et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases*, v. 151, n. 4, p. 626–633, 1985. ISSN 00221899. Citado na página 50.
- 89 SITTAMPALAM, G. et al. *Assay Guidance Manual*. [S.l.: s.n.], 2016. Citado 2 vezes nas páginas 50 e 59.
- 90 GUPTA, C. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. *Vaccine*, v. 14, n. 15, p. 1417–1420, oct 1996. ISSN 0264410X. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X96000965>>. Citado 2 vezes nas páginas 51 e 73.

- 91 RASMUSSEN, L. et al. A High-Throughput Screening Strategy to Overcome Virus Instability. *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 9, n. 2, p. 184–190, apr 2011. ISSN 1540-658X. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/adt.2010.0298>>. Citado 4 vezes nas páginas 51, 59, 73 e 104.
- 92 FARRELL, D. J. Fatal water intoxication. *Journal of Clinical Pathology*, 2003. ISSN 0021-9746. Citado na página 58.
- 93 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dec 1983. ISSN 00221759. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>>. Citado na página 59.
- 94 CHANG, T. W.; HEEL, R. C. Ribavirin and Inosiplex: A Review of their Present Status in Viral Diseases. *Drugs*, v. 22, n. 2, p. 111–128, 1981. ISSN 11791950. Citado na página 61.
- 95 GILBERT, B. E.; KNIGHT, V. *Biochemistry and clinical applications of ribavirin*. 1986. Citado 2 vezes nas páginas 61 e 103.
- 96 WITKOWSKI, J. T. et al. Design, Synthesis, and Broad Spectrum Antiviral Activity of 1-(3-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) and Related Nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1972. ISSN 15204804. Citado na página 61.
- 97 SHI, L. et al. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus in vitro and in vivo. *Archives of Virology*, v. 152, n. 8, p. 1447–1455, aug 2007. ISSN 0304-8608. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00705-007-0974-5>>. Citado na página 62.
- 98 MORFIN, F. et al. Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antiviral Therapy*, 2009. ISSN 13596535. Citado 2 vezes nas páginas 62 e 104.
- 99 CHEN, M. et al. Anti-respiratory syncytial virus prenylated dihydroquinolone derivatives from the gorgonian-derived fungus *aspergillus* sp. XS-20090B15. *Journal of Natural Products*, v. 77, n. 12, p. 2720–2724, 2014. ISSN 15206025. Citado na página 62.

- 100 FELTES, T. F. et al. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *Journal of Pediatrics*, 2003. ISSN 00223476. Citado na página 63.
- 101 RESCH, B. Product review on the monoclonal antibody palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infection. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2017. ISSN 2164554X. Citado na página 63.
- 102 HUANG, K. et al. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion. *Journal of Virology*, 2010. ISSN 0022-538X. Citado na página 63.
- 103 SCHULTZ, J.; KAMINKER, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1962. ISSN 10960384. Citado na página 65.
- 104 DAVIES, M. J. *Myeloperoxidase-derived oxidation: Mechanisms of biological damage and its prevention*. 2011. Citado 2 vezes nas páginas 65 e 81.
- 105 WINTERBOURN, C. C. et al. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. ISSN 00219258. Citado 2 vezes nas páginas 66 e 81.
- 106 HEUTINCK, K. M. et al. *Serine proteases of the human immune system in health and disease*. 2010. Citado na página 67.
- 107 KAO, R. C. et al. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *Journal of Clinical Investigation*, v. 82, n. 6, p. 1963–1973, dec 1988. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/113816>>. Citado 2 vezes nas páginas 67 e 109.
- 108 OWEN, C. A. et al. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: A novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *Journal of Cell Biology*, 1995. ISSN 00219525. Citado 2 vezes nas páginas 67 e 69.
- 109 KORKMAZ, B.; MOREAU, T.; GAUTHIER, F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, 2008. ISSN 03009084. Citado na página 67.

- 110 YING, Q. L.; SIMON, S. R. Elastolysis by proteinase 3 and its inhibition by α 1-proteinase inhibitor: A mechanism for the incomplete inhibition of ongoing elastolysis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2002. ISSN 10441549. Citado 2 vezes nas páginas 68 e 109.
- 111 GATTO, B. et al. Effective DNA inhibitors of cathepsin G by in vitro selection. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008. ISSN 14220067. Citado 2 vezes nas páginas 69 e 85.
- 112 JANOFF, A.; SCHERER, J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine*, v. 128, n. 5, p. 1137–1155, 1968. ISSN 00221007. Citado na página 71.
- 113 BURKE, J. S. et al. A permeability factor released from phagocytosing PMN-leukocytes and its inhibition by protease inhibitors. *Life Sciences*, 1964. ISSN 00243205. Citado na página 71.
- 114 WERB, Z.; GORDON, S. Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *Journal of Experimental Medicine*, 1975. ISSN 00221007. Citado na página 71.
- 115 KORKMAZ, B. et al. *Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases*. 2010. Citado na página 71.
- 116 DALL'ACQUA, W. et al. Elastase substrate specificity tailored through substrate-assisted catalysis and phage display. *Protein Engineering*, 1999. ISSN 02692139. Citado na página 72.
- 117 LIU, L. Fields Virology, 6th Edition. *Clinical Infectious Diseases*, 2014. ISSN 1058-4838. Citado 2 vezes nas páginas 73 e 125.
- 118 LILJEROOS, L. et al. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. ISSN 00278424. Citado na página 73.
- 119 GAGLIARDI, T. B. et al. Syncytia Induction by Clinical Isolates of Human Respiratory Syncytial Virus A. *Intervirology*, 2017. ISSN 14230100. Citado 2 vezes nas páginas 74 e 77.
- 120 OWEN, C. A.; CAMPBELL, E. J. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 65, n. 2, p. 137–150, feb 1999. ISSN 07415400. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jlb.65.2.137>>. Citado na página 78.

- 121 WITKO-SARSAT, V. et al. Cleavage of p21waf1 by proteinase-3, a myeloid-specific serine protease, potentiates cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. ISSN 00219258. Citado na página 83.
- 122 PEDERZOLI, M. et al. Proteinase-3 Induces Procaspase-3 Activation in the Absence of Apoptosis: Potential Role of this Compartmentalized Activation of Membrane-Associated Procaspase-3 in Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 2005. ISSN 0022-1767. Citado na página 83.
- 123 DURANTON, J. et al. Effect of DNase on the activity of neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3 in the presence of DNA. *FEBS Letters*, 2000. ISSN 00145793. Citado 3 vezes nas páginas 85, 109 e 111.
- 124 KAWABATA, K.; HAGIO, T.; MATSUOKA, S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European Journal of Pharmacology*, v. 451, n. 1, p. 1–10, 2002. ISSN 00142999. Citado na página 87.
- 125 TRALAU, T. et al. Human leukocyte elastase and cathepsin G are specific inhibitors of C5a-dependent neutrophil enzyme release and chemotaxis. *Experimental Dermatology*, v. 13, n. 5, p. 316–325, 2004. ISSN 09066705. Citado 2 vezes nas páginas 87 e 111.
- 126 CASTELVECCHI, D. Black hole pictured for first time - in spectacular detail. *Nature*, v. 568, n. 7752, p. 284–285, 2019. ISSN 14764687. Citado na página 89.
- 127 HE, H. J.; ZHENG, C.; SUN, D. W. Image Segmentation Techniques. *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation: Second Edition*, v. 7109, p. 45–63, 2016. ISSN 1996756X. Citado na página 89.
- 128 SMEE, D. F.; MATTHEWS, T. R. Metabolism of ribavirin in respiratory syncytial virus-infected and uninfected cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 30, n. 1, p. 117–121, 1986. ISSN 00664804. Citado na página 103.
- 129 CROTTY, S. et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine*, v. 6, n. 12, p. 1375–1379, 2000. ISSN 10788956. Citado na página 104.
- 130 SHIGETA, S. et al. Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6'-(R)-6'-C-methylneplanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 2, p. 435–439, 1992. ISSN 00664804. Citado na página 104.

- 131 GALLI, A. et al. Antiviral Effect of Ribavirin against HCV Associated with Increased Frequency of G-To-A and C-To-U Transitions in Infectious Cell Culture Model. *Scientific Reports*, 2018. ISSN 20452322. Citado na página 104.
- 132 CARBONELL-ESTRANY, X. et al. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: A noninferiority trial. *Pediatrics*, v. 125, n. 1, 2010. ISSN 00314005. Citado na página 106.
- 133 FELTES, T. F. et al. A randomized controlled trial of motavizumab versus palivizumab for the prophylaxis of serious respiratory syncytial virus disease in children with hemodynamically significant congenital heart disease. *Pediatric Research*, v. 70, n. 2, p. 186–191, 2011. ISSN 00313998. Citado na página 106.
- 134 ZHU, Q. et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 5, p. 674–682, 2011. ISSN 00221899. Citado na página 106.
- 135 YE, X. et al. Comparison of Palivizumab-Like Antibody Binding to Different Conformations of the RSV F Protein in RSV-Infected Adult Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, v. 217, n. 8, p. 1247–1256, 2018. ISSN 15376613. Citado na página 106.
- 136 TANG, A. et al. A potent broadly neutralizing human RSV antibody targets conserved site IV of the fusion glycoprotein. *Nature Communications*, Springer US, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019. ISSN 20411723. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12137-1>>. Citado na página 106.
- 137 CARTER, M.; Stuart Cockerill, G. *Chapter 14 Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus*. Elsevier Masson SAS, 2008. v. 43. 229–245, 246e–248e p. ISSN 00657743. ISBN 9780123743442. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)00014-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-7743(08)00014-6)>. Citado na página 106.
- 138 ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Elsevier Inc., v. 640, p. 47–52, 2018. ISSN 10960384. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>>. Citado na página 107.
- 139 VANHAMME, L. et al. The other myeloperoxidase: Emerging functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Elsevier Inc., v. 649, p. 1–14, 2018. ISSN 10960384. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.037>>. Citado na página 107.

- 140 WANG, G. Chloride flux in phagocytes. *Immunological Reviews*, v. 273, n. 1, p. 219–231, 2016. ISSN 1600065X. Citado na página 107.
- 141 ALBRICH, J. M.; MCCARTHY, C. A.; HURST, J. K. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 78, n. 1 II, p. 210–214, 1981. ISSN 00278424. Citado na página 107.
- 142 PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular and Molecular Immunology*, Nature Publishing Group, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015. ISSN 16727681. Citado na página 107.
- 143 STOIBER, W. et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 702–723, 2015. ISSN 2218273X. Citado na página 107.
- 144 CHESNEY, J. A.; EATON, J. W.; MAHONEY, J. R. Bacterial glutathione: A sacrificial defense against chlorine compounds. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 7, p. 2131–2135, 1996. ISSN 00219193. Citado na página 107.
- 145 PANAGOPOULOS, V. et al. Uncovering a new role for peroxidase enzymes as drivers of angiogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Elsevier Ltd, v. 68, p. 128–138, 2015. ISSN 18785875. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.09.006>>. Citado na página 107.
- 146 O'BRIEN, P. J. et al. *Protease activated receptors: Theme and variations*. 2001. 1570–1581 p. Disponível em: <www.nature.com/onchttp://www.nature.com/articles/1204194>. Citado na página 109.
- 147 OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiological Reviews*, v. 84, n. 2, p. 579–621, 2004. ISSN 00319333. Citado na página 109.
- 148 ASOKANANTHAN, N. et al. Activation of Protease-Activated Receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 Stimulates IL-6, IL-8, and Prostaglandin E 2 Release from Human Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 7, p. 3577–3585, 2002. ISSN 0022-1767. Citado na página 109.
- 149 COCKS, T. M. et al. A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature*, v. 398, n. 6723, p. 156–160, 1999. ISSN 00280836. Citado na página 109.

- 150 CHEUNG, W. M. et al. Altered vascular injury responses in mice deficient in protease- activated receptor-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 19, n. 12, p. 3014–3024, 1999. ISSN 10795642. Citado na página 109.
- 151 COCKS, T. M.; MOFFATT, J. D. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 14, n. 3, p. 183–191, 2001. ISSN 10945539. Citado na página 109.
- 152 CAMPBELL, E. J.; CAMPBELL, M. A.; OWEN, C. A. Bioactive Proteinase 3 on the Cell Surface of Human Neutrophils: Quantification, Catalytic Activity, and Susceptibility to Inhibition. *The Journal of Immunology*, The American Association of Immunologists, v. 165, n. 6, p. 3366–3374, sep 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10975855/>>. Citado na página 109.
- 153 STANDISH, A. J.; WEISER, J. N. Human Neutrophils Kill Streptococcus pneumoniae via Serine Proteases . *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 4, p. 2602–2609, 2009. ISSN 0022-1767. Citado na página 111.
- 154 BANGALORE, N. et al. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 23, p. 13584–13588, 1990. ISSN 00219258. Citado na página 111.
- 155 ANGELES, L. et al. ANTIBIOTIC DERIVED FROM HUMAN NEUTROPHIL. p. 63–66, 1995. Citado na página 111.
- 156 SAMBRANO, G. R. et al. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 10, p. 6819–6823, 2000. ISSN 00219258. Citado na página 111.
- 157 RENESTO, P. et al. Inhibition by recombinant SLPI and half-SLPI (Asn55-Ala107) of elastase and cathepsin G activities: consequence for neutrophil-platelet cooperation. *British Journal of Pharmacology*, v. 108, n. 4, p. 1100–1106, 1993. ISSN 14765381. Citado na página 111.
- 158 NADEL, J. A. Protease Actions on Airway Secretions: Relevance to Cystic Fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 624, n. 1, p. 286–296, 1991. ISSN 17496632. Citado na página 111.
- 159 ROCHAT, T. et al. Neutrophil cathepsin G increases permeability of cultured type II pneumocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 255, n. 5, 1988. ISSN 00029513. Citado na página 111.

160 GUERRA, M. et al. Cathepsin G Activity as a New Marker for Detecting Airway Inflammation by Microscopy and Flow Cytometry. *ACS Central Science*, v. 5, n. 3, p. 539–548, 2019. ISSN 23747951. Citado na página 111.

161 DURANTON, J. et al. DNA strongly impairs the inhibition of cathepsin G by α 1- antichymotrypsin and α 1-proteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 6, p. 3787–3792, 2000. ISSN 00219258. Citado na página 111.

162 RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 6, p. 3988–3994, 2007. ISSN 0022-1767. Citado na página 113.

163 HOUGHTON, A. M. G. et al. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature*, v. 460, n. 7255, p. 637–641, 2009. ISSN 00280836. Citado na página 113.

164 KOEHL, C.; KNIGHT, C. G.; BIETH, J. G. Compared Action of Neutrophil Proteinase 3 and Elastase on Model Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 15, p. 12609–12612, apr 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M210074200>>. Citado na página 113.

165 KORKMAZ, B. et al. Design and use of highly specific substrates of neutrophil elastase and proteinase 3. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2004. ISSN 10441549. Citado na página 113.

166 BELAAOUAJ, A. et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine*, 1998. ISSN 10788956. Citado na página 113.

167 BELAAOUAJ, A. A.; Kwang Sik Kim; SHAPIRO, S. D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science*, v. 289, n. 5482, p. 1185–1187, 2000. ISSN 00368075. Citado na página 113.

168 PHAM, C. T. *Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation*. 2006. Citado na página 113.

169 HEUBERGER, D. M.; SCHUEPBACH, R. A. Correction to: Protease-activated receptors (PARs): Mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases (*Thrombosis Journal* (2019) 17: 4 DOI: 10.1186/s12959-019-0194-8). *Thrombosis Journal*, *Thrombosis Journal*, v. 17, n. 1, p. 1–24, 2019. ISSN 14779560. Citado na página 113.

- 170 PAPAYANNOPOULOS, V.; STAAB, D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving dnase therapy. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, p. 1–7, 2011. ISSN 19326203. Citado na página 113.
- 171 SERVICE, P. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. *Research in Microbiology*, v. 158, n. 7, p. 553–554, 2007. ISSN 09232508. Citado na página 125.
- 172 WEN, Z. et al. Development and application of a higher throughput RSV plaque assay by immunofluorescent imaging. *Journal of Virological Methods*, Elsevier, v. 263, n. April 2018, p. 88–95, 2019. ISSN 18790984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.022>>. Citado na página 127.
- 173 LOPES, B. R. P. et al. Diagnosis and treatment of HEp-2 cells contaminated with mycoplasma. *Brazilian Journal of Biology*, 2020. ISSN 1519-6984. Citado na página 129.

Apêndices

APÊNDICE A – Morfologia MPO , 44h

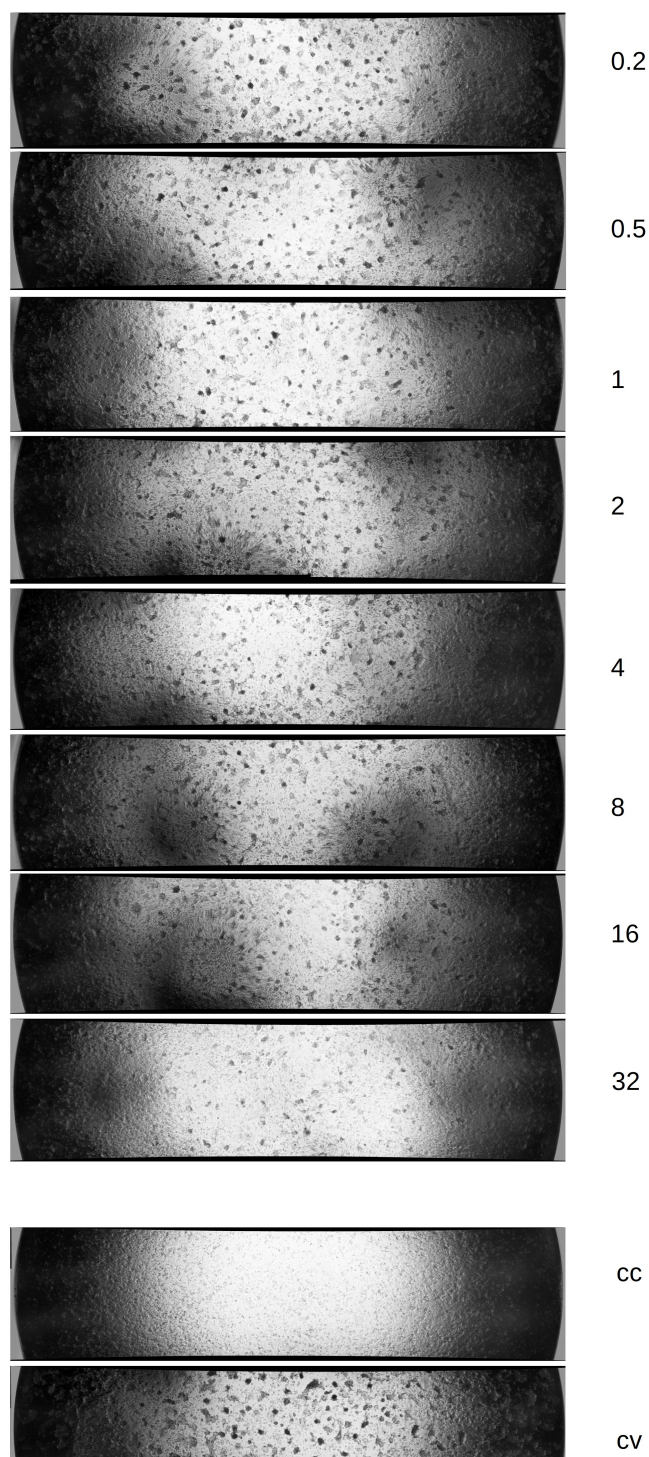


Figura 56 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 44 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Mieloperoxidase (0,1-32 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.

APÊNDICE B – Morfologia PRTN 3, 90 h

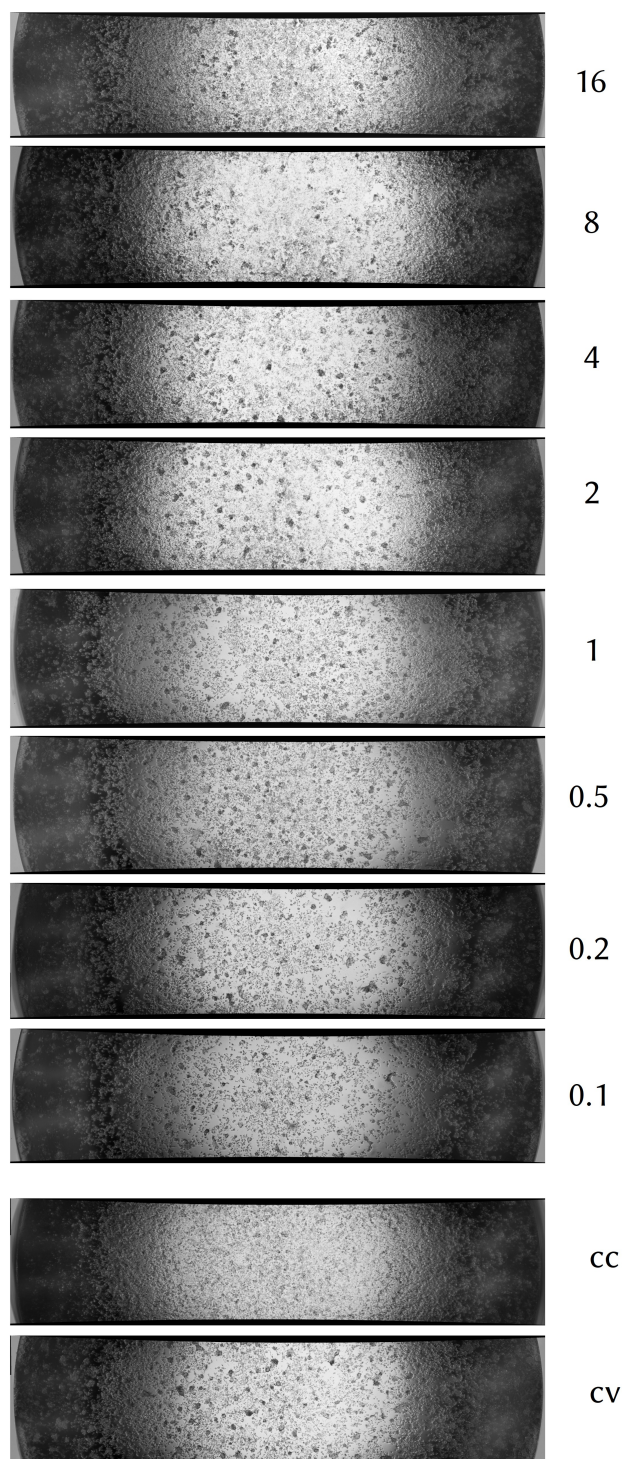


Figura 57 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 90 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Proteinase 3 (0,1-16 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.

APÊNDICE C – Morfologia CTSG , 90h

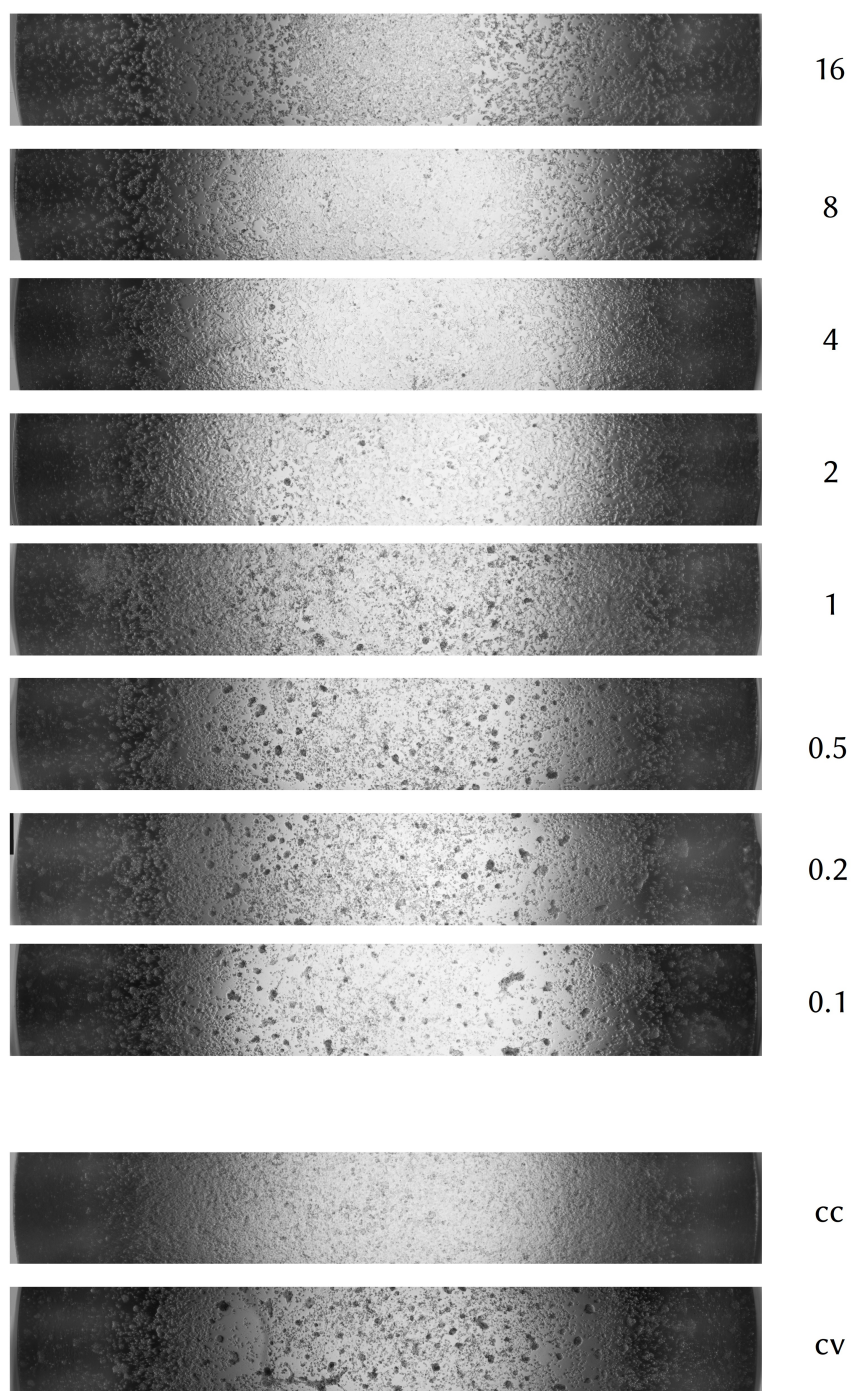


Figura 58 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 90 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Catepsina G (0,1-16 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.

APÊNDICE D – Morfologia ELANE , 40h

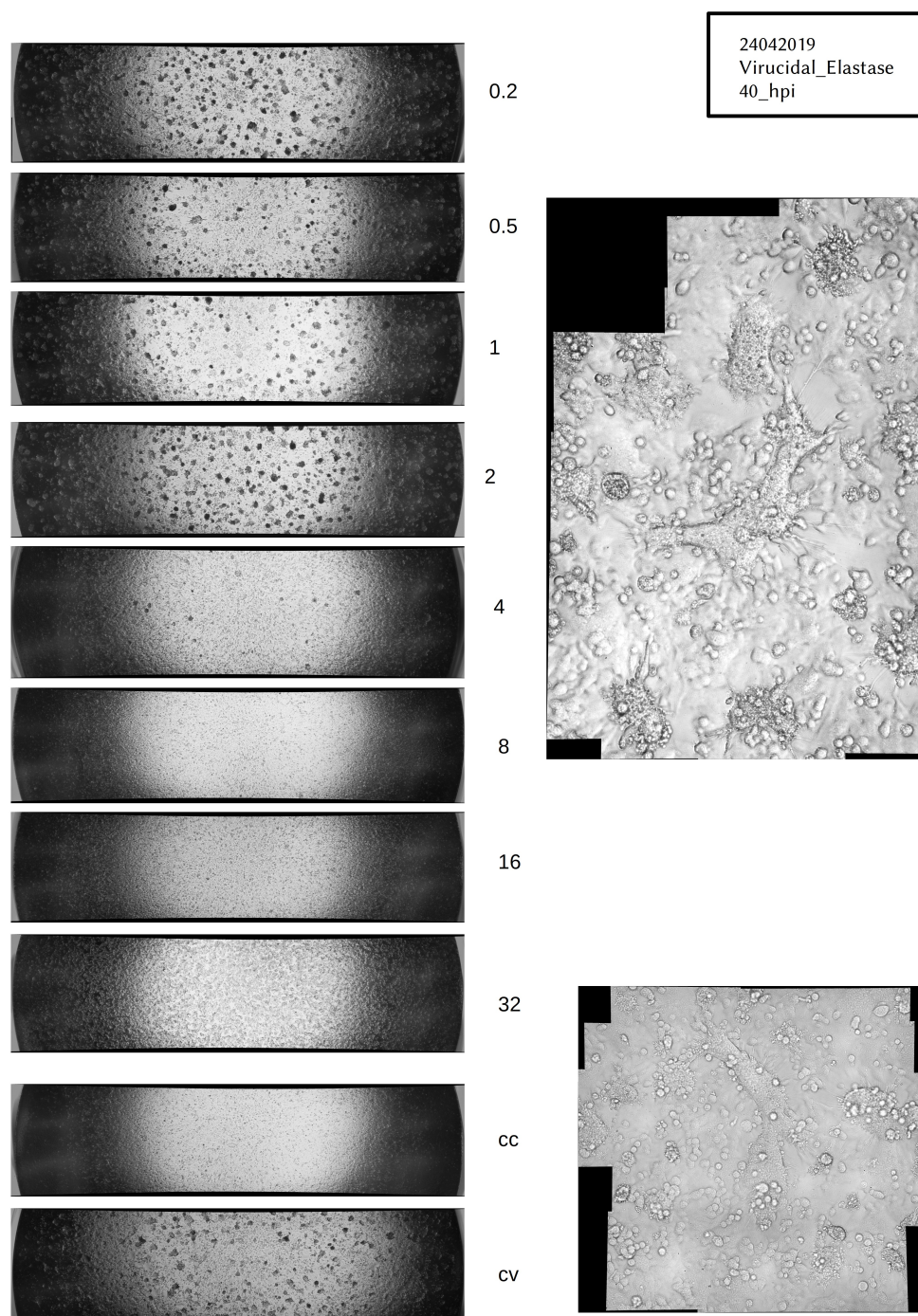


Figura 59 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 40 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Elastase (0,1-32 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.

APÊNDICE E – Morfologia ELANE , 68h

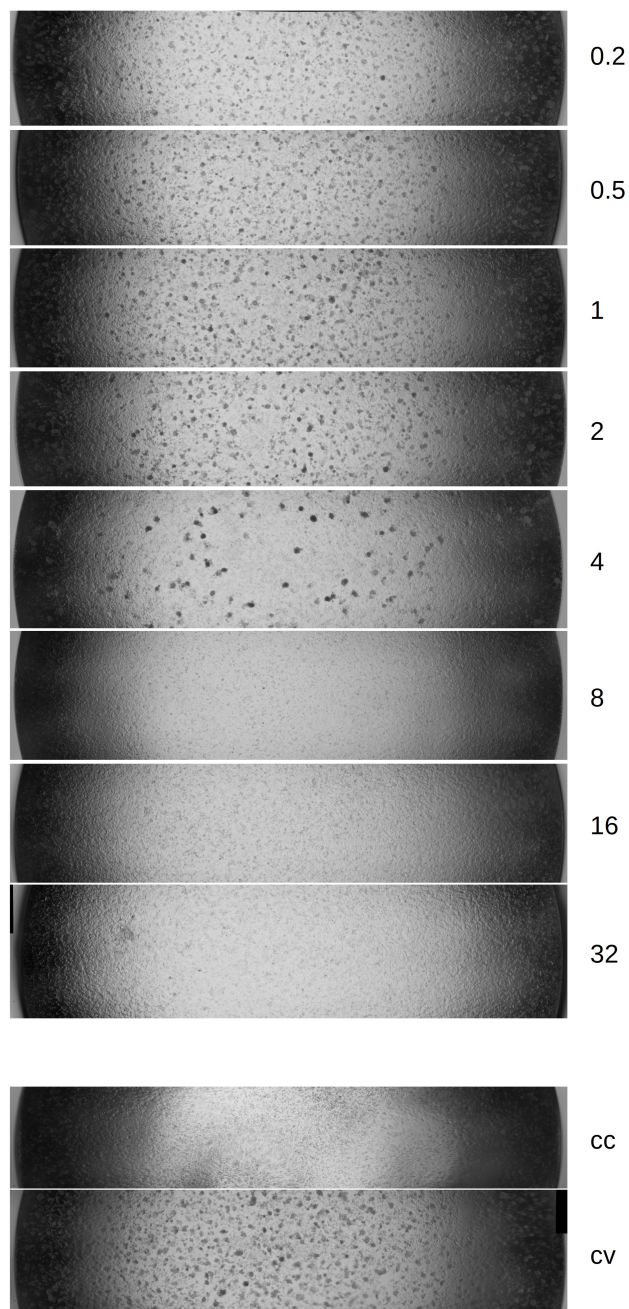


Figura 60 – Aspecto da morfologia da monocamada de células HEp-2 68 horas após a incubação com hRSV pré incubado com Elastase (0,1-32 $\mu\text{mol/mL}$). Fonte: o autor.

APÊNDICE F – Placa de Lise Proteinase 3, 120 horas

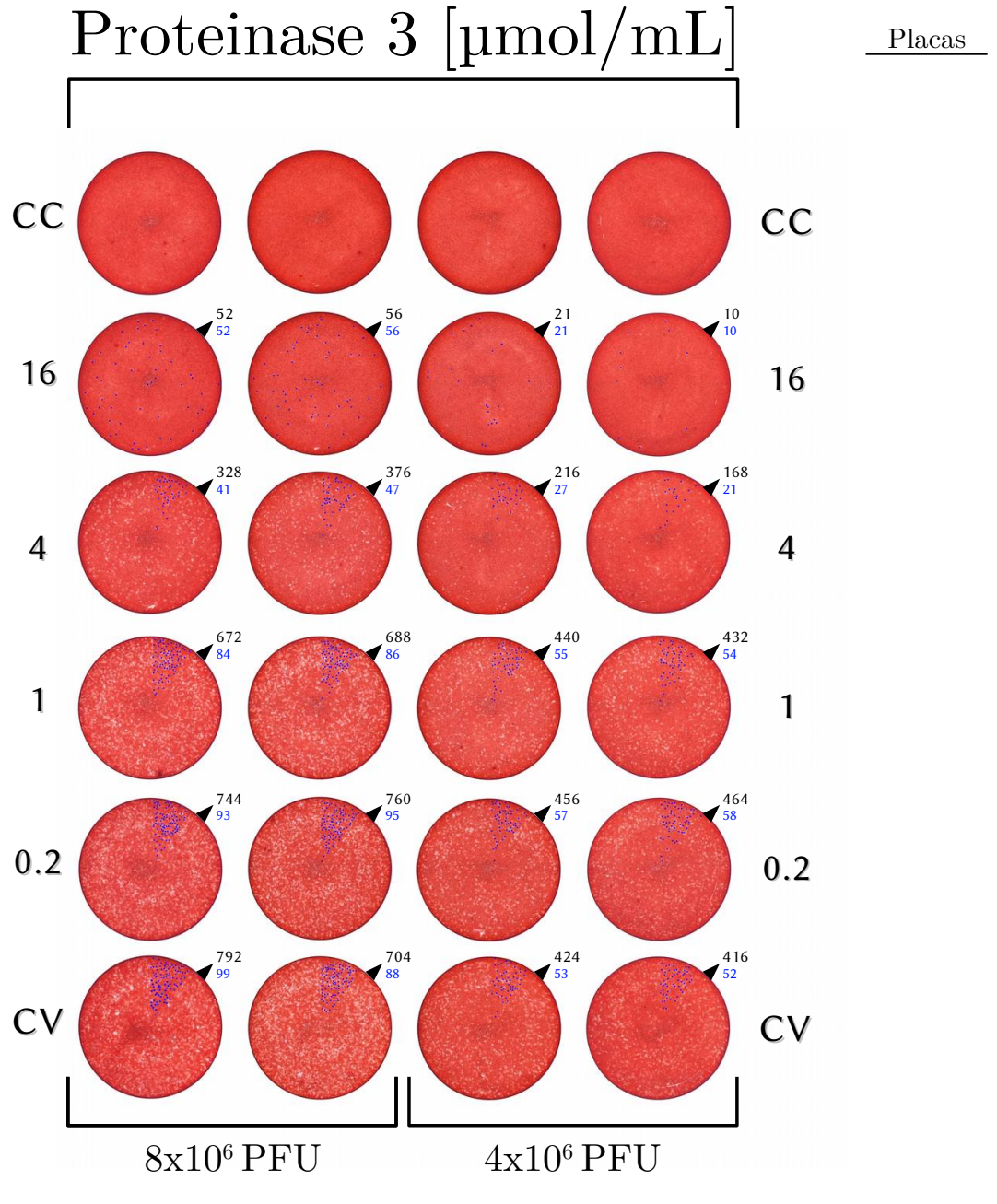


Figura 61 – Ensaio de redução de placas da Proteinase 3. Os dados dos gráficos constam na Tabela 20. Fonte: o autor.

APÊNDICE G – Placa de Lise Catepsina G, 120 horas

Placas

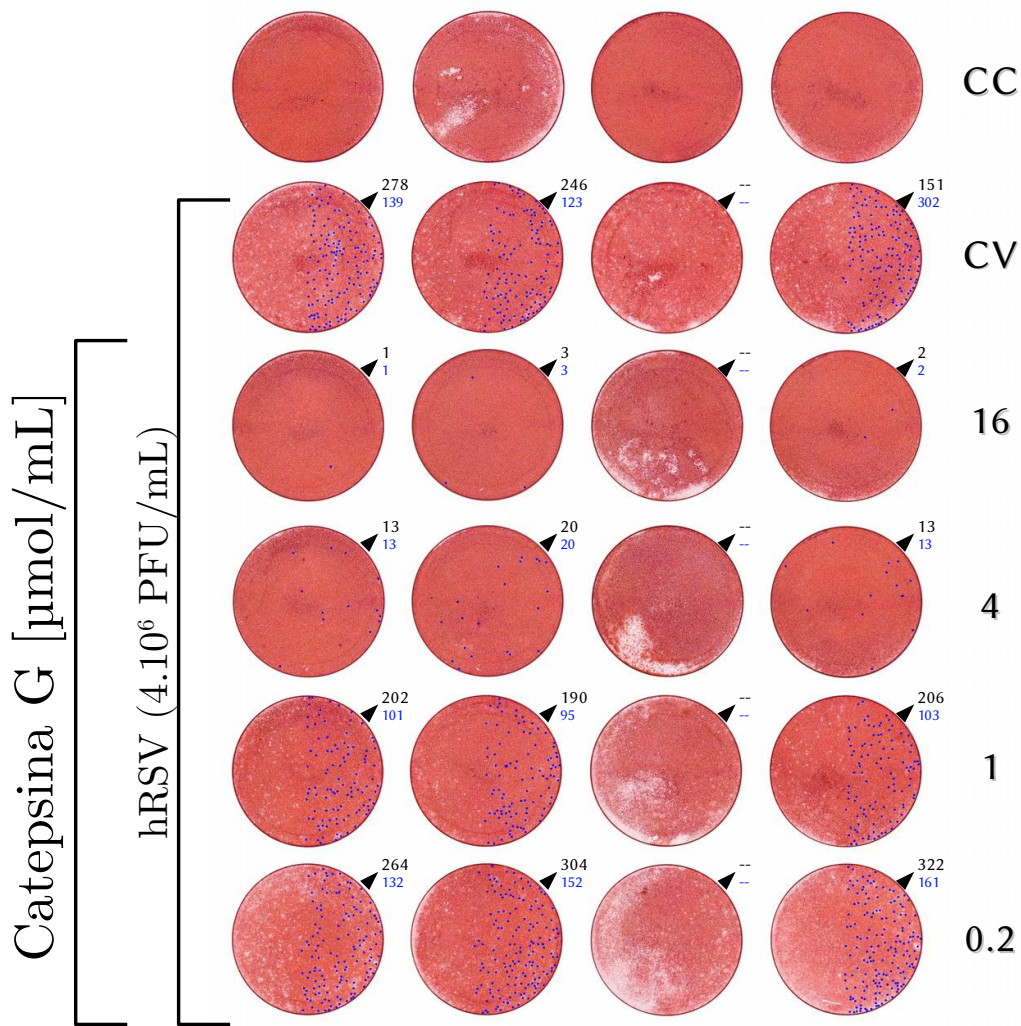


Figura 62 – Ensaio de redução de placa da Catepsina G. Os dados dos gráficos constam na Tabela 21. Fonte: o autor.

APÊNDICE H – Placa de Lise Elastase, 120 horas

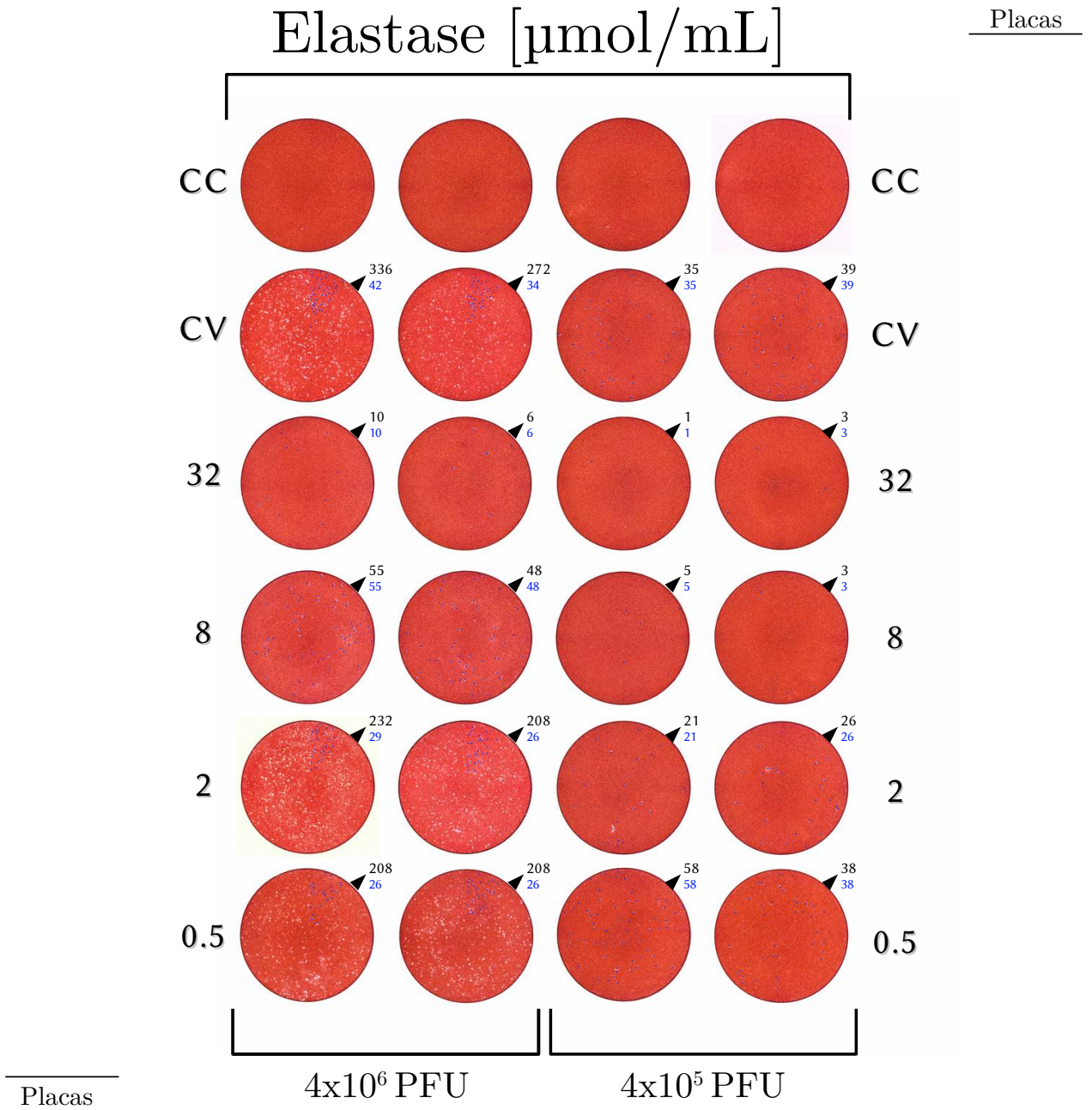


Figura 63 – Ensaio de redução de placa da Elastase. Os dados dos gráficos constam na Tabela 22. Fonte: o autor.

APÊNDICE I – Artigo publicado no período, 1

Virus Research 251 (2018) 68–77



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres



Neutrophil extracellular traps possess anti-human respiratory syncytial virus activity: Possible interaction with the viral F protein



Priscila Silva Sampaio Souza^{a,*}, Lia Vezzenfard Barbosa^a, Larissa Figueiredo Alves Diniz^a, Gabriel Soares da Silva^a, Bruno Rafael Pereira Lopes^a, Pedro Miyadaira Ribeiro Souza^a, Gabriela Campos de Araujo^{b,c}, Diogo Pessoa^a, Juliana de Oliveira^a, Fátima Pereira Souza^{b,c}, Karina Alves Toledo^a

^a Department of Biological Sciences, Universidade Estadual Paulista – UNESP (FCLAssis), Brazil

^b Department of Physics, Universidade Estadual Paulista – UNESP (IBILCE, São José do Rio Preto), Brazil

^c Centro Multusuário de Inovação Biomolecular (CMIB), Universidade Estadual Paulista – UNESP (IBILCE, São José do Rio Preto), Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Neutrophil extracellular traps
Respiratory syncytial virus
Molecular docking

ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (hRSV) is one of the main etiological agents of diseases of the lower respiratory tract, and is often responsible for the hospitalization of children and the elderly. To date, treatments are only palliative and there is no vaccine available. The airways of patients infected with hRSV exhibit intense neutrophil infiltration, which is responsible for the release of neutrophil extracellular traps (NETs). These are extracellular structures consisting of DNA associated with intracellular proteins, and are efficient in capturing and eliminating various microorganisms, including some viruses. hRSV induces the release of NETs into the lung tissue of infected individuals; however, the pathophysiological consequences of this event have not been elucidated. The objective of this study was to utilize *in vitro* and *in silico* assays to investigate the impact of NETs on hRSV infection. NETs, generated by neutrophils stimulated with phorbol myristate acetate (PMA), displayed long fragments of DNA and an electrophoretic profile suggestive of the presence of proteins that are classically associated with these structures (elastase, cathepsin G, myeloperoxidase, and histones). The presence of NETs (> 2 µg/ml) in HEP-2 cell culture medium resulted in cellular cytotoxicity of less than 50%. Pre-incubation (1 h) of viral particles (multiplicity of infection (MOI) values of 0.1, 0.5, and 1.0) with NETs (2–32 µg/ml) resulted in cellular protection from virus-induced death of HEP-2 cells. Concurrently, there was a reduction in the formation of syncytia, which is related to decreased viral spread in infected tissue. Results from western blotting and molecular docking, suggest interactions between F protein of the hRSV viral envelope and BPI (bactericidal permeability-increasing protein), a microbicidal member of NETs. Interactions occurred at sites important for the neutralization and coordination of the hRSV infection/replication process. Our results showed that the presence of NETs decreases hRSV-induced cellular damage, possibly by directly affecting viral particle capture and/or interfering with the fusion activity of the F protein. These findings broaden the understanding of the role of NETs during hRSV infection.

1. Introduction

Human respiratory syncytial virus (hRSV) is one of the major etiological agents of lower respiratory tract infections in neonates, children, and the elderly, and might cause bronchiolitis, bronchitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections (Hall et al., 1991). Among the currently available prevention measures is the administration of the Palivizumab antibody. However, the cost of administering

this drug is very high and has only been used for the immunization of high-risk children (Huang et al., 2010).

In vitro airway epithelial cells infected with hRSV produce pro-inflammatory cytokines and chemokines that promote the activation and recruitment of immune system cells, resulting in increased neutrophil transmigration to the site (Rzepka et al., 2012). Neutrophils can be found in the airways of pulmonary disease patients infected with hRSV. Due to intense viral replication and leukocyte influx, the airways can

* Corresponding author at: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis/SP, Brazil.

E-mail addresses: priscilasampaiousouza@gmail.com (P.S.S. Souza), lia.vezzenfard@gmail.com (L.V. Barbosa), laridiniz9@gmail.com (L.F.A. Diniz), gaabrielsoares10@gmail.com (G.S. da Silva), brunorpl@hotmail.com (B.R.P. Lopes), pmyadaira@outlook.com (P.M.R. Souza), bicamposaraujo@hotmail.com (G.C. de Araujo), diogo.pessoa@gmail.com (D. Pessoa), juliana@assis.unesp.br (J. de Oliveira), fatyssouza@gmail.com (F.P. Souza), karinafla@gmail.com (K.A. Toledo).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.04.001>

Received 26 June 2017; Received in revised form 2 November 2017; Accepted 1 April 2018

Available online 03 April 2018

0168-1702/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE J – Artigo publicado no período, 2.

Virus Research 276 (2020) 197805



Quercetin pentaacetate inhibits *in vitro* human respiratory syncytial virus adhesion



Bruno Rafael Pereira Lopes^{a,b}, Mirian Feliciano da Costa^{a,b}, Amanda Genova Ribeiro^{a,b}, Tiago Francisco da Silva^a, Caroline Sprengel Lima^b, Icaro Putinhon Caruso^{b,c}, Gabriela Campos de Araujo^{b,c}, Leticia Hiromi Kubo^a, Federico Iacovelli^d, Mattia Falconi^d, Alessandro Desideri^d, Juliana de Oliveira^a, Luis Octavio Regasini^b, Fatima Pereira de Souza^{b,c}, Karina Alves Toledo^{a,b,*}

^a Universidade Estadual Paulista, UNESP (FCLAssis), Brazil

^b Universidade Estadual Paulista, UNESP IBILCE, São José do Rio Preto, Brazil

^c Centro Multiusário de Inovação Biomolecular (CMIB), Universidade Estadual Paulista, UNESP IBILCE, São José do Rio Preto, Brazil

^d Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica 1, 00133, Rome, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:
Antiviral
Flavonoids
Respiratory virus
In silico
In vitro
HEp-2 cells

ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (hRSV) is one of the main etiological agents of diseases of the lower respiratory tract and is often responsible for the hospitalization of children and the elderly. To date, treatments are only palliative and there is no vaccine available. Natural products show exceptional structural diversity and they have played a vital role in drug research. Several investigations focused on applied structural modification of natural products to improved metabolic stability, solubility and biological actions them. Quercetin is a flavonoid that presents several biological activities, including anti-hRSV role. Some works criticize the pharmacological use of Quercetin because it has low solubility and low specificity. In this sense, we acetylated Quercetin structure and we used in vitro and in silico assays to compare anti-hRSV function between Quercetin (Q0) and its derivative molecule (Q1). Q1 shows lower cytotoxic effect than Q0 on HEp-2 cells. In addition, Q1 was more efficient than Q0 to protect HEp-2 cells infected with different multiplicity of infection (0.1–1 MOI). The virucidal effects of Q0 and Q1 suggest interaction between these molecules and viral particle. Dynamic molecular results suggest that Q0 and Q1 may interact with F-protein on hRSV surface in an important region to adhesion and viral infection. Q1 interaction with F-protein showed $\Delta G = -14.22$ kcal/mol and it was more stable than Q0. Additional, MTT and plate assays confirmed that virucidal Q1 effects occurs during adhesion step of cycle hRSV replication. In conclusion, acetylation improves anti-hRSV Quercetin effects because Quercetin pentaacetate could interact with F-protein with lower binding energy and better stability to block viral adhesion. These results show alternative anti-hRSV strategy and contribute to drug discovery and development.

1. Introduction

The human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the main cause of acute lower respiratory tract infections (ALRTI) in newborns and children, and is considered a public health issue at a global level, due to death and hospitalization rates as well as high treatment costs associated with it. hRSV infections affect approximately 70 % of newborns during their first year of life and 95 % of children up to 2 years, resulting in more than 3 million hospitalizations and about 200,000 deaths per year (Noor and Krilov, 2018).

The existing approaches and medicines for the treatment and

management of hRSV infections such as Ribavirin and Palivizumab come with challenges like the difficulty in administration, the high cost involved in prophylaxis, as well as the generation of drug escape mutants. Thus, research into new compounds and/or the design of new strategies against hRSV is essential to reduce infection and to control its spread, especially in areas with large flow of susceptible individuals, such as hospitals, kindergartens and primary schools. The major focus of most studies is to find molecules able to inhibit hRSV surface glycoproteins G and F, whereas these proteins are responsible for the initial steps of adhesion and fusion of the virus to the host cell, and the latter is essential to guarantee the virus entry (Battles and McLellan, 2019).

* Corresponding author at: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis, SP, Brazil.
E-mail addresses: tito.13.ax@gmail.com (T.F. da Silva), karina.toledo@unesp.br (K.A. Toledo).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197805>

Received 27 May 2019; Received in revised form 18 October 2019; Accepted 3 November 2019

Available online 09 November 2019

0168-1702/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE K – Artigo publicado no período, 3.

ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)



Diagnosis and treatment of HEp-2 cells contaminated with mycoplasma

B. R. P. Lopes^{a,b} , A. G. Ribeiro^{a,b} , T. F. Silva^a , L. V. Barbosa^a , T. I. Jesus^a ,
B. K. Matsuda^a , M. F. Costa^a and K. A. Toledo^{a,b*}

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis, SP, Brasil

^bInstituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, Universidade Estadual Paulista – UNESP, R. Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

*e-mail: karinafcla@gmail.com

Received: October 23, 2018 – Accepted: August 20, 2019 – Distributed: February 28, 2021
(With 3 figures)

Abstract

Contamination of primary and cell cultures by mycoplasmas is one of the main economic and biological pitfalls in basic research, diagnosis and manufacture of biotechnological products. It is a common issue which may be difficult to conduct surveillance on. Mycoplasma presence may affect several physiological parameters of the cell, besides being considered an important source of inaccurate and/or non-reproducible scientific results. Each cell type presents characteristic symptoms, mainly morphological, that indicate contamination by mycoplasma. HEp-2 cells originate from carcinoma of the larynx and are, therefore, part of the respiratory tract, which is one of the mycoplasma habitats. Despite the importance of these cells in several biological researches (evaluation of cell proliferation and migration, apoptosis, antiviral and antitumor compounds), the alterations induced by mycoplasma contamination in HEp-2 cells have not yet been described. Here, we describe the progressive morphological alterations in culture of HEp-2 cells infected with mycoplasma, as well as the diagnosis of the infection and its treatment. Mycoplasma contamination described in this work led to cytoplasm elongation, cell-to-cell spacing, thin plasma membrane projections, cytoplasmic vacuole fusion with neighboring cells, and, finally, cell death. Contamination was detected by fluorescence imaging (DAPI) and PCR reactions. The cultures were treated with BM-Cyclin antibiotic to eliminate contamination. The data presented here will be of relevance to researchers whose investigations involve cell culture, especially respiratory and HEp-2 cells.

Keywords: cell culture, HEp-2 cells, mycoplasma, contamination, treatment.

Diagnóstico e tratamento de células HEp-2 contaminadas por micoplasma

Resumo

A contaminação de culturas primárias e celulares por micoplasmas é uma das principais armadilhas econômicas e biológicas da pesquisa básica, diagnóstico e fabricação de produtos biotecnológicos. Trata-se de uma contaminação rotineira, mas de difícil acompanhamento. A presença de micoplasma pode afetar vários parâmetros fisiológicos da célula, além de ser considerada uma importante fonte de resultados científicos imprecisos e/ou não reprodutíveis. Cada tipo de célula apresenta sintomas característicos, principalmente morfológicos, que indicam uma contaminação por micoplasma. As células HEp-2 são originárias do carcinoma da laringe e, portanto, fazem parte do trato respiratório, um dos habitats do micoplasma. Apesar da importância destas células em diversas pesquisas biológicas (avaliação da proliferação e migração celular, apoptose, compostos antivirais e antitumorais), as alterações decorrentes da contaminação por micoplasma nestas células ainda não foi descrita. Aqui, descrevemos as alterações morfológicas progressivas na cultura de células HEp-2 infectadas por micoplasma, bem como o diagnóstico da infecção e seu tratamento. A contaminação por micoplasma descrita neste trabalho resultou em alongamento citoplasmático, espaçamento entre células, projeções delgadas da membrana plasmática, vacúolos citoplasmáticos, fusão de células vizinhas e, finalmente, morte celular. A contaminação foi detectada por imagens de fluorescência (DAPI) e reação de PCR. As culturas foram tratadas com antibiótico BM-Cyclin para eliminar a contaminação. Os dados aqui apresentados serão de relevância para pesquisadores cujas investigações envolvem cultura celular, principalmente células respiratórias e HEp-2.

Palavras-chave: cultura celular, células HEp-2, micoplasma, contaminação, tratamento.

Braz. J. Biol. 2020, Ahead of Print

1/7

Figura 66 – Primeira página do artigo publicado em 2020 na *Brazilian Journal of Biology*. Fonte: o autor.

APÊNDICE L – Artigo publicado no período, 4

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Optimization of *Eugenia punicifolia* (Kunth) D. C. leaf extraction using a simplex centroid design focused on extracting phenolics with antioxidant and antiproliferative activities



Catarina dos Santos^{1*}, Andressa Lie Mizobucchi¹, Bruna Escaramboni², Bruno Pereira Lopes³, Celio Fernando Figueiredo Angolini⁴, Marcos Nogueira Eberlin^{5,6}, Karina Alves de Toledo³ and Eutimio Gustavo Fernández Núñez⁷

Abstract

Eugenia punicifolia (Kunth) D. C. (Myrtaceae) has been showing interesting biological activities in the literature which was correlated to its phenolic compounds. In the sense of a better recovering of phenolics with the best antioxidant and antiproliferative activities, an extraction, based on multivariate analytical approach, was developed from *E. punicifolia* leaves. The different extractor solvents (ethanol, methanol and water) and their binary and ternary combinations were evaluated using a simplex-centroid mixture design and surface response methodology. The optimized crude extracts were investigated for phenol and flavonoid content and compared to their antioxidant (EC₅₀) and antiproliferative properties against HEP-2 (cell line derived from the oropharyngeal carcinoma) and mononuclear viability cells. Ethanolic extracts showed the best phenolic content with the highest antioxidant activity and moderated activity antiproliferative to HEP-2. ESI-QTOF-MS revealed the presence of quercetin and myricetin derivatives, which was correlated to activities tested. Then, simplex-centroid design allowed us to correlate the *Eugenia punicifolia* biological activities with the extracts obtained from solvent different polarity mixtures.

Keywords: Mixture design, *Eugenia punicifolia*, Extraction, Antioxidant, Antiproliferative activities

Introduction

Many biological activities are related to the phenolics compounds. They are only not synthesized in plants for growth or reproduction, but to perform genetic, physiological, or biochemical roles [1, 2]. This class of compounds contributes to plant adaptation within its environment through activities like UV protection and defence against pathogens, animals and other plants. Which has led to their use for obtaining high value-added

products like fine chemicals, phytotherapics, cosmetics and nutraceutical compounds [3]. Besides, these phytochemicals have been extensively described in the literature and traditional medicine.

Some of these phenolic compounds are antioxidants of natural origin receive increasing consumer preference over those of synthetic origin, due to factors such as tolerance, safety, a very low toxicity and the absence of side effects [4]. Antioxidants inhibit the initiation and propagation of oxidative chain reactions, which are responsible for generating reactive oxygen species (ROS), thus preventing the development of degenerative diseases and cancer [5]. Some recent evidence shows phenolics directly interact with proteins, making them ideal small

*Correspondence: catarina.santos@unesp.br

¹ Laboratory of Chemistry of UNESP-Assis (LAQUA), Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences and Letters, University of São Paulo State (UNESP), Sto Antonio Ave, 19806-900 Assis, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Figura 67 – Primeira página do artigo publicado em 2020 na *BMC Chemistry*.
Fonte: o autor.

APÊNDICE M – Artigo referente à tese
apresentada.

Elastase neutrofílica possui atividade anti-hRSV in vitro

Lopes B.R.P.[†], Toledo K. A.^{†,‡*}

[†] *Universidade Estadual Paulista, UNESP IBILCE, São José do Rio Preto, Brasil*

[‡] *Universidade Estadual Paulista, UNESP (FCLAssis), Brasil*

Resumo

O Vírus Sincicial Respiratório (hRSV) é o principal agente etiológico das infecções virais agudas do trato respiratório inferior. A infecção promove o influxo de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) que, estimulado pelas proteínas virais, projetam seu material genético formando as armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs). As NETs possuem proteínas granulares com potencial microbicida, como a Mieloperoxidase (MPO) e a Elastase (ELANE). Para investigar o papel da MPO e ELANE na infecção por hRSV, determinamos a citotoxicidade (CC50) destas proteínas sob a cultura de células HEP-2 via ensaios colorimétricos. A MPO não apresentou citotoxicidade relevante, o valor de CC50 da ELANE foi estabelecido em 12,1 $\mu\text{mol/mL}$. A pré incubação da MPO com o hRSV não apresentou efeito protetivo sob células HEP-2, a CP50 da ELANE foi de 2,2 $\mu\text{mol/mL}$. A presença da ELANE reduziu também as alterações morfológicas decorrente da replicação do hRSV (sincícios). Além disso, o perfil eletroforético sugere que essas proteínas interagem com a proteína de fusão viral F. Nossos resultados demonstram um relevante efeito virucida de proteínas presentes nas NETs.

Palavras-chave: hRSV. Armadilhas extracelulares neutrofílicas. Antiviral.

*Autor Correspondente: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis, SP, Brasil. E-mail: karina.toledo@unesp.br

23 1 Introdução

24 As infecções do trato respiratório são extremamente comuns sendo, o
25 Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) o principal agente etiológico das
26 infecções virais agudas do trato respiratório inferior, resultando mundialmente
27 em mais de 3 milhões de casos muito graves de bronquiolite por ano^[1]. A infecção
28 promove o influxo de células imunes populando o tecido predominantemente com
29 leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos)^[2]. Estimulado pelo epitélio infectado
30 e por proteínas virais, os neutrófilos secretam seu material genético imiscuído
31 com enzimas granulares que formam as armadilhas extracelulares neutrofílicas
32 (NETs)^[3]. Essas estruturas possuem ampla atividade microbica, porém apre-
33 sentam grande potencial citotóxico, sendo comumente associadas a grande parte
34 do dano tecidual, com conseqüente agravamento do quadro clínico^[4]. Pacientes
35 infectados com hRSV apresentam grande quantidade de neutrófilos e elevado
36 nível de enzimas neutrofílicas nas secreções do trato respiratório, entretanto
37 pouco se sabe sobre a capacidade anti-hRSV dessas proteínas^[4].

38 Para explorar do papel das proteínas das NETs na infecção por hRSV,
39 propôs-se avaliar o efeito de algumas enzimas sob a replicação do hRSV in vitro.
40 Para tanto, o efeito da replicação do hRSV, isoladamente ou na presença de
41 diversas concentrações de enzimas das NETs (Mieloperoxidase e Elastase) foi
42 caracterizado através de ensaios de viabilidade celular, análises morfológicas,
43 perfil eletroforético e ensaios de redução de placas de lise.

44 2 Materiais e Métodos

45 2.1 Reagentes

46 O anticorpo monoclonal Palivizumabe (Synagis[®], AbbVie Inc) e a
47 proteína de fusão recombinante do Ortopneumovírus Humano (Sino Biological
48 ref. 11049-V08B). As proteínas neutrofílicas Mieloperoxidase (EPC ref. MY167)
49 e Elastase (EPC ref. SE563) foram isoladas a partir de leucócitos humanos.
50 A solubilização e estocagem dos reagentes foram realizadas de acordo com as
51 recomendações do fabricante.

52 2.2 Células

53 Células HEp-2 (ATCC[®] CCL-23[™]) obtidas a partir do Banco de Células
54 do Rio de Janeiro (BCRJ ref. 0101) foram cultivadas em estufa umedecida a 37 °C
55 e 5% de CO₂ em meio de cultivo DMEM F12 (Sigma ref. D8900) suplementado
56 com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab ref. 0521-500) e acrescido de
57 antibióticos e antimicóticos (Gibco[®] ref. 15240-062). As HEp-2 são permissivas
58 e usualmente empregadas na propagação do hRSV^[5, 6].

59 2.3 Estoque Viral

60 O hRSV (cepa Long) foi gentilmente cedido pelo Dr. Eurico de Arruda
61 Neto (USP, Brazil) e amplificado em culturas de células HEp-2. O título viral
62 foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por
63 McKimm-Breschkin^[7] e o valor da concentração que reduz a viabilidade celular
64 em 50% (TCID₅₀)^[8] foi estabelecido em 0,6 µL/poço da placa de 96 poços.

65 2.4 Citotoxicidade

66 A citotoxicidade foi avaliada pela redução do sal de MTT 2-(3,5-
67 diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole;bromide. Monocamadas
68 confluentes de células HEP-2 (5×10^4 /poço) receberam diferentes concentrações
69 dos compostos diluído em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 2%
70 de soro fetal bovino. Após 3 dias de incubação, o meio foi substituído por
71 solução de MTT (0,5 mg/mL, Sigma ref. M5655) e a absorbância mensurada em
72 comprimento de onda de 560 nm^[9]. Os valores foram normalizados pela média
73 do grupo controle celular (somente meio e célula) e o valor da concentração que
74 reduz a viabilidade celular em 50% (CC50) foi estabelecido pela interpolação de
75 uma curva polinomial de 3 parâmetros com auxílio do software RStudio[®].

76 2.5 Atividade Antiviral

77 A atividade antiviral foi avaliada via ensaios de viabilidade celular
78 e de redução de placas de lise. A viabilidade da monocamada de células foi
79 mensurada via ensaio colorimétrico de MTT. As partículas virais foram pré
80 incubadas por 2 h a 37 °C com as proteínas das NETS, em seguida essa solução
81 foi diluída 10x e usada como inóculo sob monocamadas de células HEP-2. Após 2
82 h, essa solução foi substituída por meio de cultivo DMEM F12 e as absorbâncias
83 mensuradas após 72 h. Os valores das absorbâncias foram convertidos em índice
84 de proteção celular conforme a Equação 1, sendo DO_T a densidade ótica do
85 grupo teste; DO_{CV} a densidade ótica do controle viral e DO_{CC} densidade ótica
86 do controle celular.

$$Proteção\ Celular\ (\%) = \left(\frac{DO_T - DO_{CV}}{DO_{CC} - DO_{CV}} \right) * 100 \quad (1)$$

87

88 O ensaio de redução de placas foi baseado na metodologia previa-
89 mente descrita por McKimm-Breschkin^[7]. Monocamadas confluentes de HEp-2
90 (3×10^5 /poço) foram inoculadas com hRSV pré tratado em diferentes concen-
91 trações das proteínas das NETs. Após 2 horas o sobrenadante foi substituído
92 por 2 mL de DMEM F12 acrescido de 0,2% de agarose (Sigma ref. A9539) e
93 as células incubadas em estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂ por 5 dias.
94 As monocamada foram formalizadas (folmaldeído 1% por 24 h) e coradas com
95 solução 0,05% de vermelho neutro (Sigma ref. N4638).

96 2.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

97 O perfil eletroforético da proteína F viral pós-incubação com as enzimas
98 das NETs foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%
99 composto por água, acrilamida 30% (Bio-Rad ref: 1610156), solução Tris 1.5
100 M pH 8,8, Dodecil sulfato de sódio 10% (Bio-Rad ref: 1610301), persulfato de
101 amônio 10% (Bio-Rad ref: 1610700) e TEMED (Bio-Rad ref: 1610801). Para
102 tanto, 500 ng de proteína F (r hRSV F) foi incubada por 2 horas a 37 °C com
103 diferentes concentrações das proteínas das NETs. Ao final da corrida, os géis
104 foram corados por Nitrato de Prata, digitalizados e a densitometria das bandas
105 aparentes foi calculada pela função “Plot Lanes” do software IMAGEJ.

106 3 Resultados e Discussão

107 Embora o hRSV seja o maior agente etiológico de infecções virais do
108 trato respiratório inferior, não há vacina disponível e as atuais abordagens de
109 profilaxia e tratamento aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA)
110 possuem limitações que restringem sua aplicação^[10]. Ao se replicar no trato

111 respiratório inferior, o hRSV induz intenso influxo leucocitário que, associado
112 a liberação excessiva de NETs e o espessamento do muco, contribuem para o
113 agravamento do quadro clínico [11]. Além disso, as NETs possuem um arsenal de
114 enzimas granulares com ampla atividade microbicida como a Elastase neutrofílica
115 (ELANE) e a Mieloperoxidase (MPO), entretanto essas enzimas podem exercer
116 efeito citotóxico, principalmente em epitélios sensíveis como o pulmonar [12].

117 Para explorar se as proteínas presentes nas NETs possuem efeito in
118 vitro na replicação viral do hRSV, avaliamos a citotoxicidade das enzimas
119 granulares Elastase e Mieloperoxidase. Avaliar se a presença dessas enzimas
120 influencia na viabilidade celular constitui etapa essencial para que uma possível
121 redução na replicação viral não seja decorrente da queda do metabolismo dessas
122 células [13]. Para tanto, monocamadas de células HEp-2 foram incubadas com
123 diferentes concentrações de cada enzima por 2 h. Após 3 dias a viabilidade
124 foi mensurada por MTT, a absorbância dos poços contendo células incubadas
125 somente com meio de cultivo foram consideradas como sendo 100% viáveis
126 (Figura 1, faixa azul). O valor da CC50 da ELANE foi determinado em 12,1
127 $\mu\text{mol/mL}$ pela interpolação de uma curva polinomial de 3 parâmetros (Figura 1
128 A), a MPO não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das condições testadas
129 (Figura 1 A, 0,1–32 $\mu\text{mol/mL}$).

130 Avaliamos o efeito anti-hRSV das enzimas no protocolo virucida dentro
131 da faixa de concentração testada no ensaio de citotoxicidade. Monocamadas de
132 HEp-2 foram inoculadas por 2 h com hRSV pré incubado com as enzimas e
133 a viabilidade foi mensurada após 3 dias via MTT. A MPO apresentou índice
134 de proteção celular de 31% na maior concentração testada (Figura 1, B, 32
135 $\mu\text{mol/mL}$). A pré incubação do hRSV com ELANE reduziu o dano celular

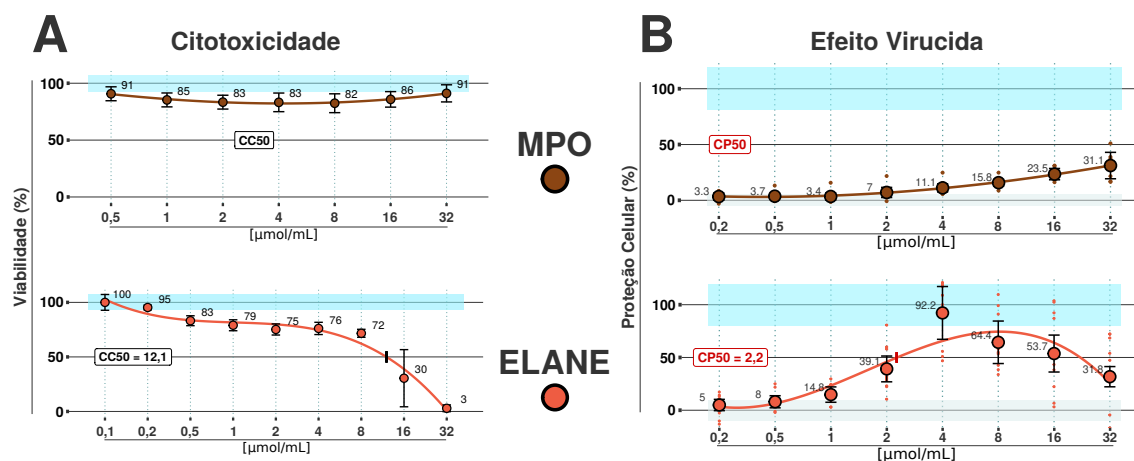


Figura 1 – Citotoxicidade e efeito virucida de proteínas presentes nas NETs. A MPO não interferiu na viabilidade das células HEp-2 em nenhuma das concentrações testadas, a CC50 da ELANE foi determinada em 12,1 $\mu\text{mol/mL}$ (A). A pré incubação da MPO com o hRSV não influenciou na redução da viabilidade celular decorrente da replicação viral, a ELANE protegeu a viabilidade da monocamada (50%) na faixa de 4–16 $\mu\text{mol/mL}$ e a CP50 foi estabelecida em 2,2 $\mu\text{mol/mL}$ (B).

136 decorrente da replicação viral de modo dose depende na faixa de 1–4 $\mu\text{mol/mL}$,
 137 a CP50 foi estabelecida em 2,2 $\mu\text{mol/mL}$ (Figura 1, B).

138 No decorrer da replicação o hRSV expressa a proteína de fusão F na
 139 superfície das células infectadas que, associado a capacidade de propagação
 140 célula-célula, culminam na fusão de células adjacentes formando estruturas
 141 multinucleadas (sincícios)^[14]. A formação de sincícios é uma das principais
 142 características morfológicas da replicação do hRSV in vitro^[15, 16, 17]. Para avaliar
 143 se as proteínas das NETs podem influenciar na formação de sincícios, o aspecto
 144 morfológico das monocamadas foi registrado em microscopia de campo claro.
 145 Monocamadas não infectadas apresentam aspecto homogêneo com células bem
 146 distribuídas por todo o poço, poços infectadas apresentam numerosos sincícios
 147 que aparecem em microscopia de campo claro como estruturas escuras compostas

148 por cerca de 15–50 células (Figura 2, A).

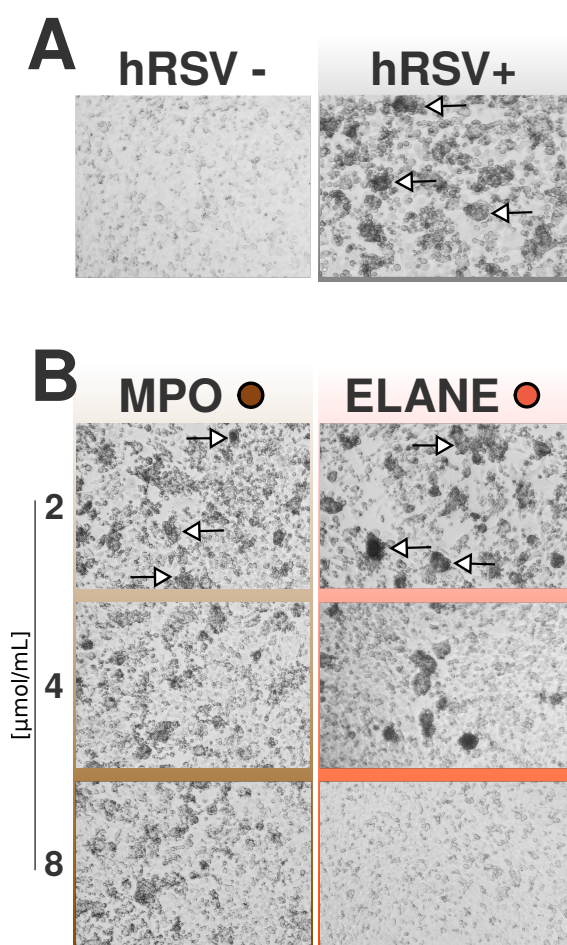


Figura 2 – Aspecto morfológico de células HEp-2 3 dias pós infecção. As monocamadas foram tratadas como descrito no protocolo de Atividade Antiviral e fotografadas em microscopia de campo claro, evidenciando a formação de sincícios (A). A pré incubação do hRSV com ELANE por 2 h reduziu drasticamente a formação de sincícios na faixa 4–8 $\mu\text{mol/mL}$ (B).

149 Monocamadas infectadas com MPO não apresentaram redução na
150 formação de sincícios em nenhuma das concentrações testadas (Figura 2, B).
151 A pré-incubação do hRSV com ELANE por 2 horas reduziu visivelmente as
152 alterações morfológicas induzidas pela replicação do hRSV. Nas concentrações de
153 4–8 $\mu\text{mol/mL}$ constatou-se drástica redução no número sincícios e manutenção

154 do aspecto homogêneo da monocamada (Figura 2, B).

155 Diante dos resultados apresentados até agora, nos pareceu evidente que
156 essas enzimas das NETs exercem efeito sobre a partícula viral de hRSV limitando
157 sua replicação. Dentre as proeínas de superfície, a proteína de fusão F tem sido
158 alvo farmacológico no desenvolvimento de drogas que possam inibir a replicação
159 viral, visto que esta proteína se mostrou fundamental nos processos iniciais de
160 infecção viral (adesão e fusão viral)^[18]. Assim, supomos que as enzimas das NETs,
161 aqui estudadas, pudessem interagir diretamente com a proteína F viral. Este
162 evento talvez desabilitasse a partícula viral a infectar novas células, explicando
163 assim os efeitos antivirais observados por nós durante os ensaios in vitro. Para
164 testar essa hipótese, incubamos a proteína r hRSV F com diferentes concentrações
165 de MPO e ELANE por 2 h a 37 °C e analisamos o perfil eletroforético dessa
166 solução em gel de poliacrilamida via densitograma.

167 A pré incubação da proteína r hRSV F com a MPO induziu alterações
168 no padrão de bandas observado no gel de poliacrilamida, uma banda com
169 peso molecular de ≈ 250 kDa torna-se visível e enfraquece à medida que a
170 concentração de MPO diminui (Figura 3, B, faixa vermelha) e, a banda de
171 menor peso molecular da r hRSV F (≈ 75 kDa) perde intensidade à medida que
172 a concentração de MPO aumenta (Figura 3, B, faixa amarela). Numa avaliação
173 preliminar, a dinâmica apresentada pelas bandas das moléculas sugere uma
174 interação inespecífica entre a MPO e a r hRSV F.

175 O perfil eletroforético do gel onde a R hRSV F foi pré incubada em
176 ELANE também mostrou alteração no padrão de bandas. Nas faixas onde a r
177 hRSV F foram incubadas com a ELANE não foi possível identificar a banda de

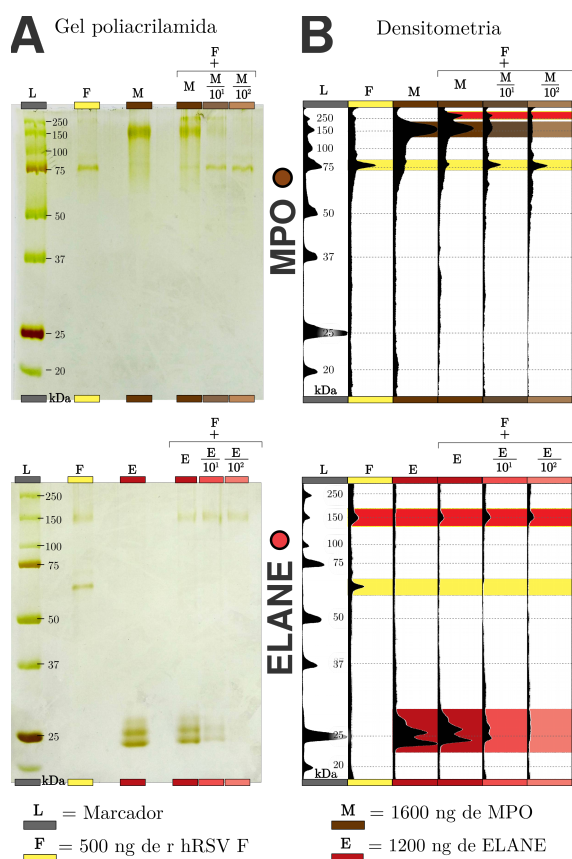


Figura 3 – Perfil eletroforético da proteína de fusão r hRSV F em gel de poliacrilamida. As proteínas da NETs foram pré-incubadas por 2 horas com a hRSV F, em seguida a solução foi separada por eletroforese por 3 horas. O gel foi revelado pelo protocolo de coloração por nitrato de prata e fotografado em negatoscópio (A). Nas faixas onde a MPO foi pré incubada com a r hRSV F nota-se a formação de um pico de maior peso molecular com ≈ 250 . Nas faixas onde a r hRSV F foi preincubada com a ELANE não foi possível identificar a faixa com ≈ 70 kDa, indicando uma interação e possivelmente uma clivagem da r hRSV F (B).

178 ≈ 70 kDa referente a proteína F , sem alterar o sinal da banda de ≈ 150 kDa
 179 (Figura 3, B). As bandas referente a ELANE pode ser observada em regiões
 180 próximas a 25 kDa (faixa em gradiente vermelho). Estes resultados nos indicam
 181 fortemente que a ELANE esteja interagindo e provavelmente clivando a r hRSV
 182 F.

183 Para confirmar o efeito da ELANE sob o a replicação do hRSV sob
 184 células HEP-2, realizamos ensaios de redução de placas de lise. A atividade
 185 virucida foi avaliada na faixa de 0,2–16 $\mu\text{mol/mL}$, a monocamada foi formalizada
 186 e corada com vermelho neutro para evidenciar os as placas de lise. A ELANE
 187 reduziu a formação de placas de lise de modo dose depende nas condições
 188 testadas, menores concentrações não exerceram efeito virucida relevante, com
 189 média de 260 contra 300 placas no grupo controle viral (Figura 4, 2 e 1 $\mu\text{mol/mL}$).
 190 Entretanto, nas maiores concentrações a redução foi notável, com média de 30
 191 placas nas concentrações de 4 e 16 $\mu\text{mol/mL}$, redução de 90% em relação ao
 192 CV (Figura 4).

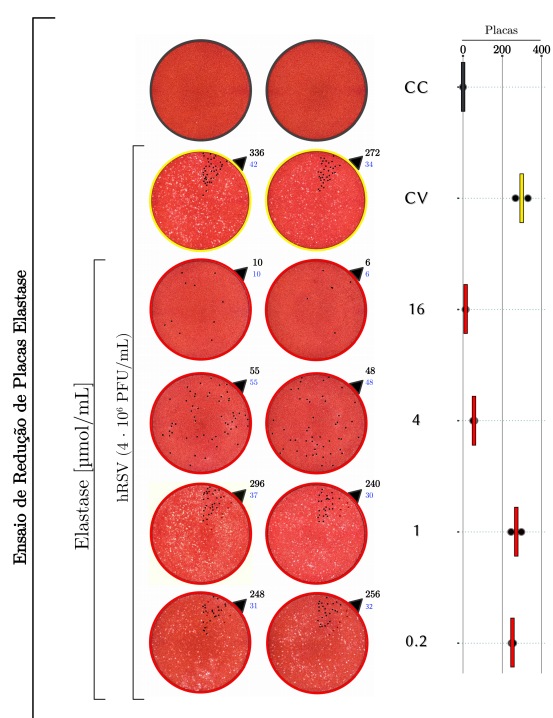


Figura 4 – Ensaio de redução de placa da Elastase. Monocamadas confluentes de HEP-2 foram inoculadas com hRSV pré-incubado em Elastase por duas horas, a ELANE reduziu a formação de placas de lise na faixa 4–16 $\mu\text{mol/mL}$.

193 Os resultados dos ensaio de redução de placas confirmam os achados

194 de ensaio anteriores, relevante proteção celular, evidente redução mas alterações
195 morfológicas decorrentes da replicação do hRSV. A redução na formação de
196 placas de lise na ordem de 96% registrada na concentração de 16 $\mu\text{mol/mL}$
197 confirma os excelentes índices de proteção celular da ELANE.

198 Nesse trabalho demonstramos que algumas proteínas das NETs podem
199 interferir na replicação do hRSV *in vitro*. A presença de ELANE induziu relevante
200 proteção celular, reduziu a formação de sincícios e reduziu a formação das placas
201 de lise. Além disso, o perfil eletroforético sugere que a proteína F viral, envolvida
202 nos processos de adesão e fusão, interage com essas enzimas gerando pesados
203 complexos ou mesmo clivagem da proteína viral.

204 O conjunto dos resultados, associado ao descrito na literatura, indica
205 que as NETs e suas enzimas possuem relevante efeito anti-hRSV, provavelmente
206 via interação com as proteínas de superfície do vírion, como a proteína de fusão
207 F^[19, 20]. O aprofundamento desse e de outros estudos envolvendo as NETs e suas
208 enzimas, certamente contribuirão na elucidação do papel dessas estruturas no
209 contexto inflamatório, principalmente nas infecções agudas do trato respiratório
210 inferior de etiologia viral.

211

Agradecimentos

212 Agradecemos o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
213 de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.434469/2019-
214 01.

215

Referências

- 216 1 TROEGER, C. et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity,
217 mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016:
218 a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*
219 *Infectious Diseases*, v. 18, n. 11, p. 1191–1210, nov 2018. ISSN 14733099. Disponível em:
220 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303104>>. Citado na página 2.
- 221 2 CORTJENS, B. et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during
222 respiratory syncytial virus disease. *Journal of Pathology*, v. 238, n. 3, p. 401–411, 2016. ISSN
223 10969896. Citado na página 2.
- 224 3 FUNCHAL, G. A. et al. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes
225 TLR-4-Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils.
226 *PLOS ONE*, v. 10, n. 4, p. e0124082, apr 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em:
227 <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124082>>. Citado na página 2.
- 228 4 BROWN, P. M.; SCHNEEBERGER, D. L.; PIEDIMONTE, G. Biomarkers of respiratory
229 syncytial virus (RSV) infection: Specific neutrophil and cytokine levels provide increased
230 accuracy in predicting disease severity. *Paediatric Respiratory Reviews*, Elsevier Ltd, v. 16, n. 4, p.
231 232–240, 2015. ISSN 15260550. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.005>>.
232 Citado na página 2.
- 233 5 SHIGETA, S. et al. The Cell to Cell Infection of Respiratory Syncytial Virus in HEp-2
234 Monolayer Cultures. *Journal of General Virology*, v. 3, n. 1, p. 129–131, jul 1968. ISSN
235 0022-1317. Disponível em: <[https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-3-1-129)
236 [1099/0022-1317-3-1-129](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-3-1-129)>. Citado na página 3.
- 237 6 ANDERSON, L. J. et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains
238 with monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases*, v. 151, n. 4, p. 626–633, 1985. ISSN
239 00221899. Citado na página 3.
- 240 7 MCKIMM-BRESCHKIN, J. L. A simplified plaque assay for respiratory syncytial
241 virus—direct visualization of plaques without immunostaining. *Journal of Virological*
242 *Methods*, v. 120, n. 1, p. 113–117, sep 2004. ISSN 01660934. Disponível em: <[https:](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093404001211)
243 [//linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093404001211](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093404001211)>. Citado 2 vezes nas páginas 3 e 5.
- 244 8 RASMUSSEN, L. et al. A High-Throughput Screening Strategy to Overcome Virus
245 Instability. *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 9, n. 2, p. 184–190, apr 2011. ISSN
246 1540-658X. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/adt.2010.0298>>. Citado
247 na página 3.
- 248 9 SITTAMPALAM, G. et al. *Assay Guidance Manual*. [S.l.: s.n.], 2016. Citado na página 4.
- 249 10 DRYSDALE, S. B.; GREEN, C. A.; SANDE, C. J. Best practice in the prevention and
250 management of paediatric respiratory syncytial virus infection. *Therapeutic Advances in*
251 *Infectious Disease*, v. 3, n. 2, p. 63–71, 2016. ISSN 2049-9361. Citado na página 5.

- 252 11 HORNSLETH, A.; LOLAND, L.; LARSEN, L. B. Cytokines and chemokines in respiratory
253 secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection.
254 *Journal of Clinical Virology*, v. 21, n. 2, p. 163–170, 2001. ISSN 13866532. Citado na página 6.
- 255 12 KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and
256 inflammation. *Nature Reviews Immunology*, Nature Publishing Group, v. 13, n. 3, p. 159–175,
257 2013. ISSN 14741733. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>>. Citado na página
258 6.
- 259 13 LIU, L. Fields Virology, 6th Edition. *Clinical Infectious Diseases*, 2014. ISSN 1058-4838.
260 Citado na página 6.
- 261 14 BORCHERS, A. T. et al. Respiratory syncytial virus - A comprehensive review. *Clinical*
262 *Reviews in Allergy and Immunology*, v. 45, n. 3, p. 331–379, 2013. ISSN 10800549. Citado na
263 página 7.
- 264 15 BITKO, V. et al. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and
265 cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiology*, 2003. ISSN
266 14712180. Citado na página 7.
- 267 16 GAGLIARDI, T. B. et al. Syncytia Induction by Clinical Isolates of Human Respiratory
268 Syncytial Virus A. *Intervirology*, 2017. ISSN 14230100. Citado na página 7.
- 269 17 TIAN, J. et al. RAGE inhibits human respiratory syncytial virus syncytium formation by
270 interfering with F-protein function. *Journal of General Virology*, v. 94, n. 8, p. 1691–1700,
271 aug 2013. ISSN 0022-1317. Disponível em: <[https://www.microbiologyresearch.org/content/
272 journal/jgv/10.1099/vir.0.049254-0](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.049254-0)>. Citado na página 7.
- 273 18 TAYYARI, F. et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory
274 syncytial virus. *Nature Medicine*, Nature Publishing Group, v. 17, n. 9, p. 1132–1135, 2011.
275 ISSN 10788956. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2444>>. Citado na página 9.
- 276 19 SOUZA, P. S. S. et al. Neutrophil extracellular traps possess anti-human respiratory
277 syncytial virus activity: Possible interaction with the viral F protein. *Virus Research*, v. 251, p.
278 68–77, jun 2018. ISSN 01681702. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/
279 S0168170217304999](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170217304999)>. Citado na página 12.
- 280 20 LOPES, B. R. P. et al. Quercetin pentaacetate inhibits in vitro human respiratory syncytial
281 virus adhesion. *Virus Research*, v. 276, p. 197805, jan 2020. ISSN 01681702. Disponível em:
282 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170219303533>>. Citado na página 12.

APÊNDICE N – Dados e Estatística

A variância dos grupos foi calculada em relação ao controle destacado em azul, grupos com $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

- Colunas
 - Cada coluna destacada em negrito corresponde a um grupo do respectivo ensaio. Os controles (**cc**: controle celular e **vc**: controle viral) ficam nas extremidades, os grupos teste possuem uma identificação única (ex: **tcid**) seguida do número do grupo.
- Legenda lateral
 - pfu_well: Número de unidade formadoras de placas de lise (PFU) contido no inóculo em cada poço da placa de 96 poços.
 - unit(*): Relação do submúltiplo com a unidade de medida.
 - qty: Valor empregado no grupo teste.
 - log2qty: Log base 2 do valor empregado (qty).
 - val*: Indica as observações de cada grupo.
 - mean: Média aritmética.
 - median: Mediana, valor central do conjunto de dados.
 - std: Desvio padrão (dispersão dos dados em relação a média aritmética).
 - p_shapiro: Valor de p do teste de normalidade de Shapiro–Wilk. Se $p \leq 0,05$ os dados do grupo não apresentam distribuição normal.
 - p_o_anova: Valor de p do teste de análise de variância ANOVA um fator.
 - kruskal_walis: Valor de p do teste de análise de variância não paramétrico de Kruskal–Wallis.
 - count: Número de sincícios detectados na monocamada.
 - total(pixels): Número total de píxeis que compõem os sincícios.
 - s_average: Média do tamanho dos sincícios
 - t_area: Área relativa ocupada por sincícios.

Tabela 7 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Proteinase 3 (Figura 15). Fonte: o autor.

#4_cc50_prot	cc	prtn1	prtn2	prtn3	prtn4	prtn5	prtn6	prtn7	prtn8
name	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
unit($\mu\text{mol/mL}$)	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
pfu_well	0	0	0	0	0	0	0	0	0
qty	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
log2qty		-3	-2	-1	0	1	2	3	4
val1	93.5829	89.84	78.0749	76.2923	74.5098	70.41	70.41	71.123	70.7665
val2	98.574	88.235	84.1355	76.2923	77.8966	71.4795	70.9447	72.7273	73.4403
val3	107.843	92.692	81.8182	79.8574	75.9358	73.975	72.3708	75.5793	69.1622
mean	100	90.255	81.3428	77.4807	76.1141	71.9548	71.2418	73.1432	71.123
median	98.574	89.84	81.8182	76.2923	75.9358	71.4795	70.9447	72.7273	70.7665
std	7.23629	2.2571	3.05814	2.05829	1.70043	1.82945	1.01359	2.25709	2.1612
p_shapiro	0.67245	0.6939	0.74213	-9E-07	0.82637	0.56653	0.50984	0.6939	0.72622
p_o_anova	1	0.0899	0.01469	0.00659	0.0051	0.00288	0.00242	0.00357	0.0027
kruskal_walis	1	0.0495	0.04953	0.0463	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953

Tabela 8 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Catepsina G (Figura 17). Fonte: o autor.

#4_cc50_prot	cc	ctsg1	ctsg2	ctsg3	ctsg4	ctsg5	ctsg6	ctsg7	ctsg8
name	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
unit($\mu\text{mol/mL}$)	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
pfu_well	0	0	0	0	0	0	0	0	0
qty	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
log2qty		-3	-2	-1	0	1	2	3	4
val1	93.5829	89.84	80.0357	77.7184	73.262	73.6185	67.9144	39.0374	33.1551
val2	98.574	90.018	78.6096	76.2923	73.4403	73.0838	64.8841	45.098	31.3725
val3	107.843	92.87	79.5009	76.6488	73.975	73.6185	68.4492	44.9198	38.3244
mean	100	90.909	79.3821	76.8865	73.5591	73.4403	67.0826	43.0184	34.284
median	98.574	90.018	79.5009	76.6488	73.4403	73.6185	67.9144	44.9198	33.1551
std	7.23629	1.7004	0.7204	0.74213	0.37106	0.30874	1.9226	3.44879	3.61082
p_shapiro	0.67245	0.1001	0.72622	0.46326	0.46326	-9E-07	0.26647	0.04936	0.47634
p_o_anova	1	0.1015	0.00798	0.00532	0.00321	0.00315	0.0016	0.00025	0.00015
kruskal_walis	1	0.0495	0.04953	0.04953	0.04953	0.0463	0.04953	0.04953	0.04953

Tabela 9 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de CC50 da Elastase (Figura 19). Fonte: o autor.

#4_cc50_prot	cc	elas1	elas2	elas3	elas4	elas5	elas6	elas7	elas8
name									
unit($\mu\text{mol/mL}$)	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
pfu_well	0	0	0	0	0	0	0	0	0
qty	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
log2qty		-2	-1	0	1	2	3	4	5
val1	93.5829	96.97	88.4135	84.6702	80.9269	82.3529	75.2228	4.45633	0.53476
val2	98.574	92.87	80.2139	77.3619	73.262	74.5098	67.9144	30.1248	1.78253
val3	107.843	96.078	80.9269	75.0446	71.3012	71.4795	71.836	56.8627	6.41711
mean	100	95.306	83.1848	79.0255	75.1634	76.1141	71.6578	30.4813	2.91147
median	98.574	96.078	80.9269	77.3619	73.262	74.5098	71.836	30.1248	1.78253
std	7.23629	2.1563	4.54225	5.02387	5.08672	5.61144	3.65745	26.205	3.09942
p_shapiro	0.67245	0.3976	0.15005	0.44447	0.37041	0.52216	0.91936	0.9775	0.38708
p_o_anova	1	0.3422	0.02705	0.01457	0.00826	0.01067	0.00376	0.01143	3E-05
kruskal_walis	1	0.2752	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953

Tabela 10 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Ribavirina (Figura 38). Fonte: o autor.

#5_prot_riba	cc	riba1	riba2	riba3	riba4	riba5	vc
name							
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	8	16	32	64	640	0
log2qty		3	4	5	6	9.32193	
val1	106.463	4.2303	42.1269	51.1163	60.6345	46.886	-10.223
val2	97.2973	1.5864	35.4289	35.4289	103.467	39.6592	-8.6369
val3	96.2397	-12.515	48.6486	43.0082	81.9624	52.879	18.8602
mean	100	-2.2327	42.0682	43.1845	82.0212	46.4747	-2E-14
median	97.2973	1.5864	42.1269	43.0082	81.9624	46.886	-8.6369
std	5.62203	9.0021	6.61007	7.8452	21.416	6.61946	16.3526
p_shapiro	0.1799	0.2815	0.9853	0.96284	0.99543	0.89718	0.09267
p_o_anova	0.00056	0.846	0.01448	0.01456	0.0062	0.01032	1
kruskal_walis	0.04953	0.8273	0.04953	0.04953	0.04953	0.04953	1

Tabela 11 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular do Palivizumabe (Figura 40). Fonte: o autor.

#6_prot_pali	cc	pali1	pali2	pali3	pali4	vc
name						
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	0.5	1	10	0
log2qty		-2	-1	0	3.32193	
val1	123.684	-12.902	22.6816	37.9261	67.8136	-17.894
val2	84.7255	5.5453	25.4283	77.7553	103.847	4.4297
val3	91.6629	-4.4773	63.2207	89.9767	146.143	13.4635
mean	100.024	-3.9446	37.1102	68.5527	105.935	-0.0002
median	91.6629	-4.4773	25.4283	77.7553	103.847	4.4297
std	20.7817	9.2351	22.654	27.2182	39.2065	16.1411
p_shapiro	0.32027	0.9046	0.11585	0.43246	0.91191	0.54168
p_o_anova	0.00276	0.7319	0.08196	0.01991	0.01237	1
kruskal_walis	0.04953	0.8273	0.04953	0.04953	0.04953	1

Tabela 12 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Mieloperoxidase (Figura 41). Fonte: o autor.

#7_prot_mpo	cc	mpo1	mpo2	mpo3	mpo4	mpo5	mpo6	mpo7	mpo8	vc
name										
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	0
log2qty		-2	-1	0	1	2	3	4	5	
val1	95.7885	4.1219	3.04659	1.97133	6.00358	11.1111	16.7563	16.2186	21.595	4.9283
val2	100.627	8.4229	4.6595	2.77778	4.12186	11.1111	8.69176	19.7133	16.4875	0.0896
val3	103.584	8.1541	-0.7168	-1.2545	8.15412	15.4122	11.9176	19.1756	17.0251	-5.0179
val4	139	7.1967	13.2218	15.7322	21.7573	24.7699	24.7699	30.795	37.0711	-9.3724
val5	84.7699	-3.0962	-0.8368	0.9205	6.94561	6.19247	15.7322	21.2552	35.8159	4.6862
val6	76.2343	-1.841	4.68619	4.1841	7.19665	10.7113	12.4686	18.4937	27.0293	4.6862
val7	117.72	1.6949	2.61941	4.31433	4.77658	5.85516	18.0277	26.3482	38.829	4.7766
val8	94.6071	3.3898	4.31433	3.54391	5.23883	9.39908	17.1032	31.1248	51.0015	-2.1572
val9	87.6733	2.0031	2.00308	-1.3867	-0.7704	5.70108	16.641	28.0431	35.4391	-2.6194
mean	100	3.3385	3.66636	3.42255	7.04713	11.1404	15.7898	23.4631	31.1437	1E-16
median	95.7885	3.3898	3.04659	2.77778	6.00358	10.7113	16.641	21.2552	35.4391	0.0896
std	18.8528	4.1422	4.14563	5.08311	6.09132	6.01281	4.54758	5.65966	11.4622	5.191
p_shapiro	0.45845	0.5062	0.05097	0.01136	0.01187	0.04086	0.56799	0.22935	0.49598	0.1223
p_o_anova	5.4E-11	0.151	0.11726	0.17674	0.01777	0.00067	4E-06	9E-08	1E-06	1
kruskal_walis	0.00035	0.2694	0.50692	0.56579	0.00801	0.00034	0.00035	0.00035	0.00035	1

Tabela 13 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Proteinase 3 (Figura 42). Fonte: o autor.

#8_prot_prtn	cc	prtn1	prtn2	prtn3	prtn4	prtn5	prtn6	prtn7	prtn8	vc
name										
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	0
log2qty		-3	-2	-1	0	1	2	3	4	
val1	95.4839	-19.765	-26.276	-9.3842	-9.912	45.6891	54.1349	76.4809	97.5953	-10.44
val2	92.4927	-11.672	-8.3284	-10.968	-2.522	52.9032	49.5601	82.6393	96.5396	-4.1056
val3	112.023	2.4047	12.61	-1.8182	19.824	58.0059	70.3226	94.0762	118.71	14.545
val4	114.117	-2.2949	-1.4604	3.96384	0.83449	53.1989	79.4854	109.527	119.541	-2.5035
val5	89.7079	8.1363	1.25174	1.87761	-0.6259	54.242	69.8887	97.8442	102.434	1.0431
val6	96.1752	-1.2517	8.76217	2.92072	-3.338	47.1488	65.7163	87.8303	94.9235	1.4604
val7	112.707	-2.8733	-3.8446	5.86807	8.13436	58.3165	53.7839	72.3998	93.2821	-2.7115
val8	89.2351	-3.6827	-2.3877	7.48685	4.73493	51.032	60.259	81.7887	94.2533	3.4399
val9	89.5589	-5.7871	-4.654	3.76366	9.42938	56.2121	64.3059	81.1412	93.2821	0.688
val10	108.499									-1.4164
mean	100	-4.0873	-2.703	0.4123	2.95104	52.9721	63.0508	87.0809	101.173	-3E-15
median	95.8296	-2.8733	-2.3877	2.92072	0.83449	53.1989	64.3059	82.6393	96.5396	-0.3642
std	10.5397	7.9896	11.0434	6.5436	8.72464	4.42695	9.57584	11.6194	10.5608	6.3994
p_shapiro	0.02677	0.6848	0.33037	0.08916	0.86787	0.53086	0.85841	0.61816	0.00347	0.229
p_o_anova	1.3E-15	0.2329	0.51711	0.89128	0.40876	2E-13	4E-12	2E-13	5E-15	1
kruskal_walis	0.00016	0.253	0.51363	0.32719	0.46243	0.00024	0.00024	0.00024	0.00024	1

Tabela 14 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Catepsina G (Figura 43). Fonte: o autor.

#9_prot_ctsg	cc	ctsg1	ctsg2	ctsg3	ctsg4	ctsg5	ctsg6	ctsg7	ctsg8	vc
name										
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	0
log2qty		-3	-2	-1	0	1	2	3	4	
val1	139.526	2.2134	8.85375	32.332	80.2372	75.9684	82.8458	70.0395	75.4941	-3.9526
val2	80.9486	9.8024	16.6798	26.8775	58.419	57.7075	50.5929	50.5929	-25.534	9.8024
val3	79.5257	15.02	18.5771	27.8261	54.3874	63.6364	52.7273	49.8814	4.11067	-5.8498
val4	115.153	-1.453	7.57654	9.13337	68.4484	66.7359	67.2029	40.2698	34.6653	-3.0099
val5	106.279	-0.2076	0.41515	5.39699	54.2813	70.9393	69.2268	43.6949	44.4733	-7.0576
val6	78.5677	19.564	-2.5428	12.8697	65.4904	88.22	101.609	59.5745	55.6824	10.067
val7	128.721	9.4386	-3.4988	35.3133	54.8413	30.1871	69.7315	84.3775	7.24166	-2.3855
val8	119.275	-9.3572	4.80065	29.6989	36.5338	46.786	49.227	44.1009	69.9756	1.6221
val9	52.0038	-7.8926	-11.066	22.3759	25.3051	39.463	37.2661	62.4085	41.4158	0.7634
val10	102.441									-13.751
val11	120.26									7.7299
val12	77.2986									6.0212
mean	100	4.1253	4.42172	22.4249	55.3271	59.9604	64.4921	56.1044	34.1695	7E-15
median	104.36	2.2134	4.80065	26.8775	54.8413	63.6364	67.2029	50.5929	41.4158	-0.8111
std	26.1198	9.9829	9.66652	10.7476	16.4402	18.4393	19.6138	14.419	33.175	7.3864
p_shapiro	0.6203	0.7522	0.89783	0.31073	0.67536	0.96715	0.71659	0.36934	0.66845	0.7095
p_o_anova	1.2E-11	0.289	0.24846	1.8E-05	2.8E-09	3E-09	2E-09	4E-10	0.00249	1
kruskal_walis	3.2E-05	0.3742	0.35555	0.00065	0.00012	0.00012	0.00012	0.00012	0.01287	1

Tabela 15 – Dados e cálculos estatísticos utilizados para a interpretação dos ensaios de Proteção Celular da Elastase (Figura 44). Fonte: o autor.

#10_prot_elas	cc	elas1	elas2	elas3	elas4	elas5	elas6	elas7	elas8	vc
name										
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	0
log2qty		-2	-1	0	1	2	3	4	5	
val1	102.11	11.046	21.8231	11.8545	32.0611	46.8792	109.654	102.38	68.4329	-5.119
val2	88.6394	17.243	25.0561	24.5173	30.4445	50.9205	99.1468	87.0229	72.2048	8.6215
val3	88.6394	13.202	3.50247	22.3619	28.5586	55.7701	91.0642	103.727	72.2048	-3.5025
val4	93.7584	-10.177	3.9529	16.0639	80.656	117.494	57.9479	92.2624	53.9108	12.532
val5	105.882	-13.204	-1.0934	8.99916	59.9664	119.512	53.4062	38.2675	30.1934	24.138
val6	103.188	-2.6072	-2.1026	29.6888	57.9479	121.026	54.9201	43.3137	47.3507	14.045
val7	98.8774	3.5739	5.48851	3.191	22.337	117.301	42.6317	22.337	-4.4674	-6.6442
val8	101.302	3.191	4.72267	2.80808	10.4665	100.07	33.8246	3.191	-17.487	-16.737
val9	97.2609	14.296	8.16895	12.3811	23.1028	108.877	38.4196	6.63727	-16.721	-27.334
val10	99.9551	17.742	9.70063	8.16895	27.6978	98.155	36.1221	-10.211	-38.93	0.5106
val11	99.9551									-1.787
val12	120.431									1.2764
val13	105.887									
val14	92.767									
val15	83.6838									
val16	83.1791									
val17	86.7115									
val18	97.8133									
val19	81.1606									
val20	80.656									
val21	93.2717									
val22	103.364									
val23	187.132									
val24	104.373									
val25	70.2019									
val26	75.9457									
val27	79.392									
val28	148.7									
val29	108.111									
val30	119.981									
val31	98.155									
val32	101.601									
val33	100.07									
val34	101.218									
val35	96.6233									
mean	100	5.4305	7.92194	14.0035	37.3239	93.6004	61.7137	48.8927	26.6692	-4E-15
median	98.8774	7.3101	5.10559	12.1178	29.5016	104.473	54.1632	40.7906	38.7721	-0.6382
std	20.8181	11.183	8.96447	9.06312	21.624	30.3457	27.948	43.9939	42.3984	13.903
p_shapiro	4.7E-06	0.2522	0.08493	0.55888	0.11837	0.01172	0.06409	0.16868	0.1333	0.9756
p_o_anova	1.3E-19	0.3318	0.13681	0.01284	8.7E-05	6E-09	1E-06	0.00158	0.05277	1
kruskal_walis	2.5E-07	0.4159	0.20069	0.01567	0.0001	2E-05	2E-05	0.00608	0.33368	1

Tabela 16 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Mieloperoxidase (Figura 32). Fonte: o autor.

#11_qty_mpo										
name	cc	mpo1	mpo2	mpo3	mpo4	mpo5	mpo6	mpo7	mpo8	vc
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	0
log2qty		-2	-1	0	1	2	3	4	5	
count	0	126	95	84	85	111	86	80	76	101
total(pixels)	0	31642	26589	26216	25861	30630	31525	21220	20898	29942
s_average	0	84.71	94.4103	105.276	102.628	93.0819	123.65	89.474	92.754	100
t_area	0	9.791	8.227	8.112	8.002	9.477	9.754	6.566	6.466	9.265

Tabela 17 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Proteinase 3 (Figura 35). Fonte: o autor.

#12_qty_prtn										
name	cc	prtn1	prtn2	prtn3	prtn4	prtn5	prtn6	prtn7	prtn8	vc
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	0
log2qty		-3	-2	-1	0	1	2	3	4	
count	0	57	52	72	84	51	63	56	35	43
total(pixels)	0	114222	113435	81933	116843	93945	66188	75499	52570	136420
s_average	0	63.163	68.7597	35.8688	43.8444	58.0623	33.115	42.496	47.3435	100
t_area	0	30.745	30.533	22.053	31.45	25.287	17.815	20.322	14.15	36.719

Tabela 18 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Catepsina G (Figura 34). Fonte: o autor.

#14_qty_elas										
name	cc	elas1	elas2	elas3	elas4	elas5	elas6	elas7	elas8	vc
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.2	0.5	1	2	4	8	16	32	0
log2qty		-2	-1	0	1	2	3	4	5	
count	0	149	176	115	117	43	2	4	22	143
total(pixels)	0	84.382	87.2052	93.2556	131.352	122.047	24.926	25.127	35.9265	100
s_average	0	14.186	17.317	12.1	17.34	5.921	0.056	0.113	0.892	16.135
t_area	0	31274	38177	26676	38227	13054	124	250	1966	35570

Tabela 19 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Quantificação Sincicial da Elastase (Figura 35). Fonte: o autor.

#11_qty_elas										
name	cc	elas1	elas2	elas3	elas4	elas5	elas6	elas7	elas8	vc
pfu_well	0	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.2	0.5	1	2	4	8	16	32	0
log2qty		-2	-1	0	1	2	3	4	5	
count	0	149	176	115	117	43	2	4	22	143
total(pixels)	0	84.382	87.2052	93.2556	131.352	122.047	24.926	25.127	35.9265	100
s_average	0	14.186	17.317	12.1	17.34	5.921	0.056	0.113	0.892	16.135
t_area	0	31274	38177	26676	38227	13054	124	250	1966	35570

Tabela 20 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Redução de Placas da Proteinase 3 (Figura 53 e Apêndice F). Fonte: o autor.

#15_plaq_elas											
name	cc	prtn1	prtn2	prtn3	prtn4	vc1	prtn5	prtn6	prtn7	prtn8	vc2
pfu_well	0	400	400	400	400	400	800	800	800	800	800
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	1	4	16	0	4	8	16	32	0
log2qty		-2	0	2	4		-2	0	2	4	
val1	0	464	432	168	10	416	760	688	376	56	704
val2	0	456	440	216	21	424	744	672	328	52	792

#norm_data						
name	cc	prtn9	prtn10	prtn11	prtn12	vc
unit($\mu\text{mol/mL}$)		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	1	4	16	0
log2qty		-2	0	2	4	
val1	0	1.1048	1.02857	0.4	0.02381	0.99048
val2	0	1.0857	1.04762	0.51429	0.05	1.00952
val3	0	1.016	0.91979	0.50267	0.07487	0.94118
val4	0	0.9947	0.8984	0.4385	0.06952	1.05882

Tabela 21 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Redução de Placas da da Catepsina G (Figura 54 e Apêndice G). Fonte: o autor.

#16_plaq_ctsg						
name	cc	ctsg1	ctsg2	ctsg3	ctsg4	vc
pfu_well	0	400	400	400	400	400
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	1	4	16	0
log2qty		-2	0	2	4	
val1	0	322	206	13	2	302
val2	0	304	190	20	3	246
val3	0	264	202	13	1	278

#norm_data						
name	cc	ctsg1	ctsg2	ctsg3	ctsg4	vc
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.25	1	4	16	0
log2qty		-2	0	2	4	
val1	0	1.1695	0.74818	0.04722	0.00726	1.09685
val2	0	1.1041	0.69007	0.07264	0.0109	0.89346
val3	0	0.9588	0.73366	0.04722	0.00363	1.00969

Tabela 22 – Dados utilizados para a interpretação dos ensaios de Redução de Placas da da Elastase (Figura 55 e Apêndice H). Fonte: o autor.

#17_plaq_elas											
name	cc	elas1	elas2	elas3	elas4	vc1	elas5	elas6	elas7	elas8	vc2
pfu_well	0	400	400	400	400	400	40	40	40	40	40
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.5	2	8	32	0	0.5	2	8	32	0
log2qty		-2	0	2	4		-2	0	2	4	
val1	0	38	26	3	3	39	208	208	48	6	272
val2	0	58	21	5	1	35	208	232	55	10	336

#norm_data						
name	cc	elas9	elas10	elas11	elas12	vc
unit(µmol/mL)		-6	-6	-6	-6	
qty	0	0.5	2	8	32	0
log2qty		-2	0	2	4	
val1	0	1.027	0.7027	0.08108	0.08108	1.05405
val2	0	1.5676	0.56757	0.13514	0.02703	0.94595
val3	0	0.6842	0.68421	0.15789	0.01974	0.89474
val4	0	0.6842	0.76316	0.18092	0.03289	1.10526