



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

Priscila Silva Sampaio de Souza

Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) possuem  
promissora atividade anti-hRSV através de sua interação com a  
proteína F viral

São José do Rio Preto  
2017

Priscila Silva Sampaio de Souza

Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) possuem  
promissora atividade anti-hRSV através de sua interação com a  
proteína F viral

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Alves de Toledo

São José do Rio Preto

2017

Souza, Priscila Silva Sampaio de.

Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) possuem promissora atividade anti-hRSV através de sua interação com a proteína F viral / Priscila Silva Sampaio de Souza. – São José do Rio Preto, 2017  
124 f. : il., tabs.

Orientador: Karina Alves de Toledo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 3. Neutrófilos. 4. Infecções respiratórias. 5. Docking molecular. 6. Antivirais I. Toledo, Karina Alves de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Priscila Silva Sampaio de Souza

Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) possuem  
promissora atividade anti-hRSV através de sua interação com a  
proteína F viral

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

### Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Alves de Toledo  
UNESP – Assis  
Orientadora

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe  
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Alarcão Dias-Melício  
UNESP – Botucatu

São José do Rio Preto  
03 de março de 2017

***“Todo o nosso conhecimento se inicia com sentimentos”  
Leonardo da Vinci***

**Dedico este projeto aos meus pais, Vaneide da Silva de Souza e Pedro Sampaio de Souza, ao meu irmão Pedro Henrique Silva Sampaio de Souza, e ao meu namorado Fabiano Casale Pires, por me apoiarem, acreditarem sempre em mim e por estarem sempre ao meu lado.**

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karina Alves de Toledo, pela dedicação, apoio e incentivo em todos os momentos, pelo conhecimento transmitido, pela participação no meu crescimento e aprendizagem e por ter sido uma orientadora não só na universidade, mas na vida.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia de Neutrófilos e Vírus (LAINV), pela amizade, parceria e apoio, dentro e fora do laboratório, os quais tornaram essa caminhada prazerosa, compartilhando os bons e maus momentos, e ajudando sempre que possível.

A todos os colegas da UNESP Assis e do IBILCE, pela convivência, amizade e conhecimentos compartilhados.

A todos os colaboradores do trabalho, que possibilitaram o desenvolvimento do mesmo.

À banca examinadora, pelo aceite do convite em participar da minha defesa e pelas contribuições com o meu trabalho.

.Aos meus pais Vaneide da Silva de Souza e Pedro Sampaio de Souza e meu irmão, Pedro Henrique Silva Sampaio de Souza, pelo incentivo, apoio, e pela paciência, não me deixando desanimar com as dificuldades e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado Fabiano Casale Pires, pela torcida, pelo apoio e companheirismo de todos os dias, pelo incentivo e pelo amor dedicado, os quais me deram forças para fazer o meu melhor, e por ser capaz de tornar todos os momentos, até os mais difíceis, em momentos felizes.

Às minhas amigas de graduação e de vida, Amanda, Izabella, Jéssica, Larissa, Ludmila e Natália, pela amizade sincera de tantos anos, pelo apoio, torcida e encorajamento de sempre e por terem sido as pessoas que fizeram essa caminhada se iniciar de uma maneira inesquecível.

Aos meus amigos de toda uma vida, Alisson, Augusto, Bianca, Carol, Emerson, Lenon, Lucas, Mateus, Pamela, Rafael e Tatiane, por serem tão especiais, por terem compartilhado cada momento, por comemorarem cada vitória e pelo incentivo e acolhimento que sempre me dedicaram.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE e a Faculdade de Ciências e Letras - Assis, pela infraestrutura que permitiu minha formação profissional.

Aos professores da Graduação em Ciências Biológicas e Pós-Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP pela oportunidade de especialização.

Ao apoio financeiro da CAPES.

**À mim.**

## RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) atua como um dos principais agentes etiológicos das mais de 15 milhões de infecções do trato respiratório inferior em crianças e idosos anualmente. Apesar de décadas de inúmeras pesquisas em busca de compostos anti-hRSV, atualmente não existem vacinas ou medicamentos eficazes contra esta infecção viral. Dentre os leucócitos presentes nas vias aéreas de indivíduos acometidos por hRSV, os neutrófilos são predominantes e se mostram em estado de ativação, incluindo a indução da liberação das NETs. As NETs, compostas por DNA e proteínas granulares/nucleares tem sido descritas como eficientes na captura e eliminação de diversos microrganismos. Em relação ao hRSV, o vírus induz a liberação das NETs no tecido pulmonar de indivíduos infectados, mas as consequências desse evento ainda não foram elucidadas. O objetivo deste trabalho foi investigar se as NETs possuem algum efeito anti-hRSV. Para tanto, foram realizados ensaios *in vitro* e *in silico*. NETs geradas a partir do estímulo com PMA e avaliadas por eletroforese apresentaram longos fragmentos de DNA e proteínas de peso molecular próximos daqueles determinados para elastase, catepsina G, mieloperoxidase e histonas. As NETs apresentaram índices de citotoxicidade celular abaixo de 50%, com uma CC50 >67µg/mL. Ensaio virucida realizado com diferentes MOIs (0.1, 0.5 e 1.0), mostraram eficiência das NETs (CE50  $\cong$  1 e IS  $\cong$  66). As interações obtidas *in silico* demonstram forte interação entre as proteínas elastase e histonas com a proteína F-hRSV, pré e pós-fusão, em regiões importantes para a infecção/replicação do vírus. Os dados obtidos indicam que as NETs tem um promissor papel antiviral e este efeito pode estar relacionado à sua ação direta na captura de partículas virais e/ou na interferência da atividade de fusão da proteína F. Em conclusão, nossos resultados associados a dados prévios da literatura, apontam que o

contato do hRSV com os neutrófilos induz a liberação das NETs e que estas agem na neutralização do vírus.

**Palavras-chave:** Redes Extracelulares dos Neutrófilos, Vírus Sincicial Respiratório, Antivirais, *Docking Molecular*

## ABSTRACT

Annually the Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) acts as one of the main etiological agents of more than 15 million infections in the lower respiratory tract of children and elderly. Despite decades of extensive research in search of anti-hRSV compounds, there are currently no vaccines or effective drugs against this viral infection. Among the present leukocytes in the airways of individuals affected by hRSV, the neutrophils are predominant and are shown in activation state, including the induction of the release of NETs. NETs, composed by DNA and granular/nuclear proteins have been described as efficient in capturing and eliminating several microorganisms. Regarding hRSV, the virus induces the release of NETs in the lung tissue of infected individuals, but the consequences of this event have not yet been elucidated. The goal of this study was to investigate whether the NETs have some anti-hRSV effect. For that purpose, assays were performed *in vitro* and *in silico*. NETs generated from the stimulation with PMA and evaluated by electrophoresis showed long DNA fragments and proteins of molecular weight close to those determined for elastase, cathepsin G, myeloperoxidase, and histones. The NETs presented cellular cytotoxicity indices below 50%, with CC50 >67 $\mu$ g/mL. Virucide assay performed with different MOIs (0.1, 0.5 and 1.0), showed efficiency of the NETs (CE50  $\cong$  1 and IS  $\cong$  66). The interactions obtained *in silico* demonstrate strong interaction between elastase and histone proteins with the F-hRSV protein, pre and postfusion, in important regions for the infection/replication of the virus. The data obtained up to date indicate that the NETs have a promising antiviral role and this effect may be related to its direct action in the capture of viral particles and/or interference of the fusion activity of F protein. In conclusion, our results associated with previous literature data, indicate

that the contact of the hRSV with neutrophils induces the release of NETs and that these act in the neutralization of the virus.

**Key words:** Neutrophils Extracellular Traps, Respiratory Syncytial Virus, Antivirals, Molecular Docking

## Súmario

<b>1. Introdução</b> .....	14
1.1. Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV).....	14
1.1.1. Epidemiologia e Patogênese.....	14
1.1.2. Estrutura e Genoma.....	16
1.1.3. Proteína F.....	19
1.1.4 Profilaxia e Tratamento.....	22
1.2. Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs).....	24
1.2.1. Imunidade Inata e o hRSV.....	24
1.2.2. NETs e o Vírus Sincicial Respiratório.....	25
<b>2. Objetivos</b> .....	31
2.1. Obejtivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	32
3.1. Declaração de ética.....	32
3.2. Cultura celular.....	32
3.3. Estoque viral.....	32
3.4. Purificação de neutrófilos humanos.....	33
3.5. Estimulação de neutrófilos humanos para geração das NETs.....	33
3.6. Visulização das NETs por Microscopia de fluorescência.....	34
3.7. Análise do perfil eletroforético das NETs.....	34
3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
3.7.2. Eletrofores em gel de agarose.....	35
3.8. Avaliação de atividade enzimática.....	35
3.8.1. Avaliação da atividade de elastase.....	35
3.8.2. Avaliação da atividade de mieloperoxidase.....	35
3.9. Ensaio colorimétrico de viabilidade por adição do sal de MTT.....	36
3.10. Determinação da CC50 das NETs em células HEp-2.....	37
3.11. Avaliação da ação anti-hRSV das NETs.....	37
3.11.1. Ensaio virucida.....	37

3.11.2. Análise do ensaio virucida.....	38
3.12. Determinação do Índice de Seletividade.....	38
3.13. Análise Estatística.....	39
3.14. Análises de Bioinformática.....	39
3.14.1. <i>Docking molecular</i> .....	39
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>41</b>
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>73</b>
Referências.....	74
Anexo A.....	89
Anexo B.....	91
Anexo C.....	92

## **1. Introdução**

### **1.1. Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)**

#### **1.1.1. Epidemiologia e Patogênese**

As formas de infecções mais frequentes que afetam o ser humano são as infecções do trato respiratório, das quais, predominam as de causa viral. Os vírus também podem acometer o trato respiratório inferior, causando bronquiolite, bronquite, pneumonia e infecções pulmonares obstrutivas crônicas. O vírus respiratório sincicial humano (hRSV) foi identificado e descrito pela primeira vez em 1956 e é um dos principais agentes etiológicos destas infecções, sendo causa frequente de infecções do trato respiratório inferior de recém-nascidos, crianças e idosos, devido ao sistema imunológico mais frágil (Hall et al., 1991; Volling et al., 2014)

As formas graves da infecção por hRSV acometem principalmente grupos de alto risco, como crianças com doença cardíaca congênita e pacientes imunodeprimidos, nos quais a infecção provoca uma grave mortalidade (Falsey e Walsh, 2000, 2006; Leung, Kenner e Davis, 2005), além de crianças fumantes passivas e que estão expostas à poluição do ar (Black, 2003). O vírus acomete de 3% a 7% de adultos saudáveis (Falsey et al., 2005), mas em indivíduos imunocompetentes a infecção é resolvida, na maioria dos casos, em aproximadamente uma semana sem evoluir para maiores complicações ou apresentar sequelas (Borchers et al., 2013).

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 no mundo, com cerca de 5% de hospitalizações, resultando em mais de 160 mil mortes anuais. O hRSV é considerado a principal causa isolada de infecção respiratória na infância (Falsey et al., 2005), infectando acima de 50% das crianças nos primeiros anos de vida e cerca de 100% das crianças de até três anos de idade (Mejias, 2005), sendo que aproximadamente, 25% a 40% de bebês e crianças ao ter a primeira exposição ao hRSV apresentam sinais ou sintomas de bronquiolite ou pneumonia (Krilov, 2011; Kasper, 2005).

Estima-se que houve cerca de 66 mil a 199 mil mortes de crianças com menos de cinco anos de idade em todo o mundo no ano de 2005 em decorrência da infecção respiratória aguda (IRA) causada pelo hRSV (Resch e Michel-Behnke 2013). No Brasil, no ano de 2005, na cidade de São José do Rio Preto - SP, a prevalência de hRSV em crianças hospitalizadas por Infecções Agudas das Vias Aéreas Inferiores (IVAI) foi de 29,3% (Salomão Júnior et al., 2011), sendo o vírus responsável por 20,7% das infecções respiratórias virais em crianças que frequentam creche (Bonfim et al., 2011).

O hRSV possui dois subtipos, A e B, com distribuição mundial e altamente contagiosos, sendo comum encontrar indivíduos infectados pelos dois subtipos simultaneamente. Vários estudos, no entanto, relacionam as formas mais graves de IRA ao subtipo A. As infecções por hRSV ocorrem o ano todo, entretanto, sua sazonalidade é maior e mais evidente em duas estações do ano, outono e inverno, quando costumam ocorrer os surtos epidêmicos e o maior número de casos graves que requerem hospitalização (Falsey et al., 2005). Anticorpos específicos para hRSV possuem meia-vida muito curta e a quantidade de IgA<sup>+</sup>, secretada por células B de memória, diminui com o tempo (Falsey, Singh e Walsh, 2006). Portanto, infecções prévias com hRSV não geram imunidade permanente (Walsh et al., 2004; Hall et al., 1991), e reinfecções são comuns, podendo ocorrer durante toda a vida (Kim e Chang, 2016).

A transmissão do hRSV ocorre pelo contato direto com secreções e aerossóis expelidos por pessoas infectadas ou com superfícies e objetos contaminados (Mejias e Ramilo, 2008). O vírus pode permanecer viável em superfícies sólidas por até 6 horas, em luvas de borracha por 90 minutos, e na pele por 20 minutos (Wright e Piedimonte, 2011). Crianças com até aproximadamente 3 anos de idade ou indivíduos com hábitos onicofágicos são especialmente susceptíveis ao contágio por diversas doenças, incluindo o hRSV, devido ao contato constante das mãos com a mucosa bucal (Mejias e Ramilo, 2008).

Geralmente, o hRSV penetra no corpo pelas mucosas das narinas, dos olhos ou boca, atinge a mucosa respiratória e infecta as células epiteliais da fossa nasal, iniciando sua replicação no epitélio nasofaríngeo onde induz a produção de uma série de citocinas (IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) que promovem o influxo leucocitário. A intensa replicação e atividade de fusão viral culmina na formação de sincícios

(massas multinucleadas formadas pela fusão de células), levando à disfunção e necrose tecidual (Kurt-Jones et al., 2000; Rajan et al., 2003; Dudas e Karron, 1998).

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 (Falsey e Walsh, 2000, 2006; Leung, Kellner, Davies, 2005).

O hRSV pode ocasionar infecções tanto no trato respiratório superior quanto no inferior (Wu et al., 2007), mas a maioria se restringe ao trato respiratório superior, tendo duração média de até 8 dias. As infecções no trato respiratório inferior geralmente são mais graves e quando o vírus atinge essa região pode causar pneumonia e/ou bronquiolite grave, bloqueando as vias respiratórias pela produção excessiva de muco, edema e debris celulares (Hornsleth, Loland, Larsen, 2001).

No trato respiratório inferior a infecção pode durar meses, a respiração torna-se ofegante, difícil e dolorosa, agravando o quadro clínico do paciente e o resultado final é o bloqueio das vias respiratórias, podendo levar o paciente ao óbito (Hornsleth, Loland, Larsen, 2001).

### **1.1.2. Estrutura e Genoma**

O hRSV é membro do gênero *Orthopneumovirus*, família *Paramyxoviridae*, pertencente à ordem *Mononegavirales*. É um vírus envelopado com nucleocapsídeo helicoidal (Santos, Romanos, Wigg, 2008), fita de RNA simples, linear, de polaridade negativa, não segmentado, com aproximadamente 15.2 kb, e 10 genes que codificam onze proteínas devido a sequência de leitura aberta no gene M2 (Cheng et al., 2005). Os membros da família *Paramyxoviridae* geralmente são esféricos, apresentam bicamada lipídica, herdada da célula do hospedeiro durante o processo de replicação, e são vírus de tamanho variável. O hRSV possui um tamanho médio de 120 a 350 nm (Tiwari et al., 2014).

Com apenas um sorotipo, o hRSV é subdividido em dois subtipos antigênicos, A e B (Johnson et al., 1987; Norrby, Mufson, Sheshberadaran, 1986), e as variações na proteína transmembrana G são utilizadas atualmente na determinação de qual subtipo o vírus pertence, geralmente através de ensaios de neutralização *in vitro* e

pela reatividade a anticorpos monoclonais (Johnson et al., 1987, Botosso et al., 2009)].

As proteínas virais podem ser classificadas em estruturais, quando constituem alguma estrutura da partícula viral, e não estruturais, quando não são observadas na estrutura do vírion. As duas proteínas não estruturais do hRSV (NS1 e NS2) auxiliam na transcrição do genoma e são responsáveis pela evasão da resposta imune (Collins e Graham, 2008; Lo, Brazas, Holtzman, 2005; Zhang et al., 2005). Dentre as estruturais, cinco (N, P, L, M2-1 e M2-2) formam o complexo nucleocapsídeo envolvido na replicação e transcrição viral, e quatro são proteínas de membrana (M, SH, G e F), sendo G e F glicoproteínas fundamentais para a infecção do hRSV, estando envolvidas na adesão e fusão do vírus com a célula hospedeira (Bawage et al., 2013; Peters e Crowe, 2008) (Figura 1).

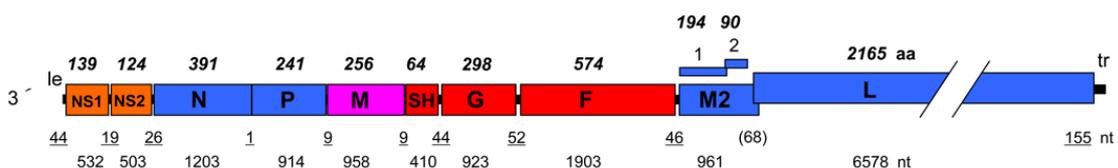


Figura 1. Mapa gênico do hRSV. Na extremidade 3' a sequência líder (le) e na região 5' a sequência trailer (tr). Acima dos genes está representado o comprimento de aminoácidos da proteína. Acima da sequência do gene M2 está representado a sequência de leitura aberta (ORF) da proteína M2. Destacado em vermelho as três proteínas transmembrana que medeiam as etapas iniciais do processo de entrada do vírus à célula hospedeira. (Adaptado de Collins e Melero, 2011).

As proteínas NS1 e NS2 são duas proteínas pequenas (139 e 124 resíduos, respectivamente) e as primeiras transcritas em grande quantidade. Ambas são pouco conservadas e antagonizam a resposta antiviral celular e a indução de produção de interferon (IFN), que é secretado pelas células eucarióticas como uma das primeiras linhas de defesa contra infecção viral (Schlender et al., 2000; Bossert e Conzelmann, 2002; Bossert et al., 2003; Spann et al., 2004)

A proteína N é a primeira dentre as estruturais a ser transcrita, originando o capsômero que quando agrupado ao redor do genoma forma o capsídeo. A associação do capsídeo ao genoma forma o nucleocapsídeo, um complexo de simetria helicoidal que confere estabilidade e resistência as RNAses, além de proteger o vírus da produção de interferons pela célula hospedeira (Collins e Graham, 2008).

A fosfoproteína P atua como uma chaperona, auxiliando outras proteínas virais a atingirem a conformação terciária correta, além de aumentar a especificidade do encapsulamento do RNA viral, impedindo que a proteína N se ligue aos RNAs celulares (Spehner, Drillien, Howley, 1997).

O envelope viral é constituído principalmente pela proteína M que, nos estágios iniciais da infecção, pode atuar inibindo a transcrição das moléculas da célula hospedeira, priorizando a transcrição das moléculas virais. A proteína M também desempenha papel crucial no brotamento da partícula viral, facilitando a montagem e inibindo atividade transcricional do nucleocapsídeo antes da encapsulação através de interação com o complexo ribonucleoprotéico (RNP) (Lenard, 1996; Ghildyal et al., 2002).

A proteína estrutural SH é a menor dentre todas, ainda sem função claramente definida ela é descrita como não essencial para a replicação viral. No entanto, alguns trabalhos indicam que ela atua em conjunto com a proteína G melhorando a atividade da proteína F (Techarpornkul, Barretto, Peebles, 2001), inibindo a apoptose pelo bloqueio do TNF- $\alpha$  ou alterando a permeabilidade da membrana (Collins e Mottet, 1993).

A glicoproteína G é pouco conservada dentre os subtipos de hRSV e é responsável pela adsorção do vírion à membrana da célula hospedeira (Walsh, Hruska, 1983). Estudos apontam que esta ligação ocorra através de interações com heparina sulfatada e com os receptores CX3CR1 e TLR4, modulando a resposta imune e dando então início a etapa de internalização (McLellan, Ray, Peebles, 2013; Kurt-Jones et al., 2000).

A glicoproteína de fusão F é uma proteína transmembrana, responsável pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, liberando o nucleocapsídeo no citosol. A sua função essencial para a infecção viral a torna a mais estudada dentre as proteínas do hRSV (Collins e Mottet, 1993).

Devido a uma fase de leitura aberta, o gene M2 codifica duas proteínas, a M2-1 e M2-2. A proteína M2-1 atua na transcrição dos mRNAs virais prevenindo a parada precoce da transcrição (Collins et al., 1996). 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 (Cheng et al., 2005).

A maior proteína viral é a proteína L (2165 resíduos), possui seis regiões conservadas entre a família dos vírus de RNA com polaridade negativa, fita simples e não segmentada, o que a torna um alvo promissor para as pesquisas de compostos com atividade antiviral (Tiong-Yip, 2014). A proteína L atua como uma RNA-polimerase-RNA-dependente, auxilia na formação da estrutura do *cap* e age no processo de poliadenilação (Stec, Hill, Collins, 1991; Morin et al., 2013).

As glicoproteínas (F, G, SH) são ligadas ao envelope viral e se estendem através da bicamada lípica. As proteínas M2-1 e M2-2 ficam dispersas no interior do envelope e as demais proteínas (N, P e L) associam-se ao RNA (Collins e Grahnan, 2008) (Figura 2).

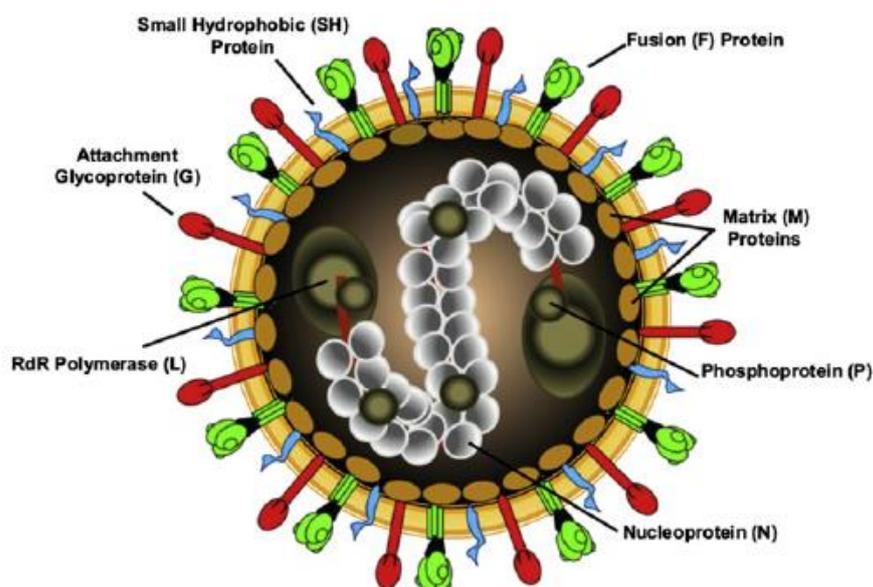


Figura 2. Representação da estrutura do hRSV (Lay et al., 2013).

### 1.1.3. Proteína F

A proteína de fusão F é classificada como uma glicoproteína transmembrana do tipo I, pois é uma proteína de envelope que possui *coiled-coils* como as demais proteínas de fusão de outros vírus. É formada por três unidades monoméricas idênticas, sendo portanto um homotrímero (Luque e Russel, 2007; Russel et al., 2001). Além de mediar a fusão do envelope viral à membrana citoplásmica, permitindo assim a infecção, é responsável pela fusão de células infectadas com células adjacentes, levando à formação de sincícios, células gigantes multinucleadas que é característica citopática do hRSV (Collins et al., 2001).

Trata-se de uma proteína altamente conservada entre os subtipos, A e B, do hRSV e também entre os *Pneumovirus*, o que a torna um alvo importante para o desenvolvimento de vacinas e drogas antivirais (Melero e Mas, 2015). Juntamente com a proteína G, é alvo primário dos anticorpos do hospedeiro. Trabalhos realizados com mutantes deficientes em proteína G e SH mostram que a proteína F é a única proteína transmembrana essencial à infecção do vírion *in vitro* (Bukreyev et al., 1997; Jin et al., 2000; Karron et al., 1997).

A proteína F (Figura 3) é sintetizada como um precursor inativo, denominado F<sub>0</sub>, com 574 aminoácidos e peso molecular de 67 kDa, que precisa ser então clivado duas vezes para exercer sua função. As clivagens são feitas por proteases do tipo furina durante a passagem pelo complexo de Golgi, resultando em três polipeptídios, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, ligados por uma ponte dissulfeto e um polipeptídeo de 27 aminoácidos (pep27) que se dissocia após a clivagem (Gonzalez-Reyes et al., 2001; McLellan, Ray, Peebles, 2013). Uma vez clivada, a proteína F está totalmente ativa. A proteína F é então expressa na superfície viral, onde causa a fusão vírion-célula, um passo essencial que inicia a infecção, ou na superfície celular, onde é capaz de causar a fusão célula-célula, levando à formação de sincícios (McLellan et al., 2013).

Portanto, a proteína F inicialmente existe na superfície viral em um estado metaestável de pré-fusão que, após se ligar à moléculas receptoras expressas na superfície celular, desencadeia grandes mudanças conformacionais para um estado estável de pós-fusão (Barel et al., 2008).

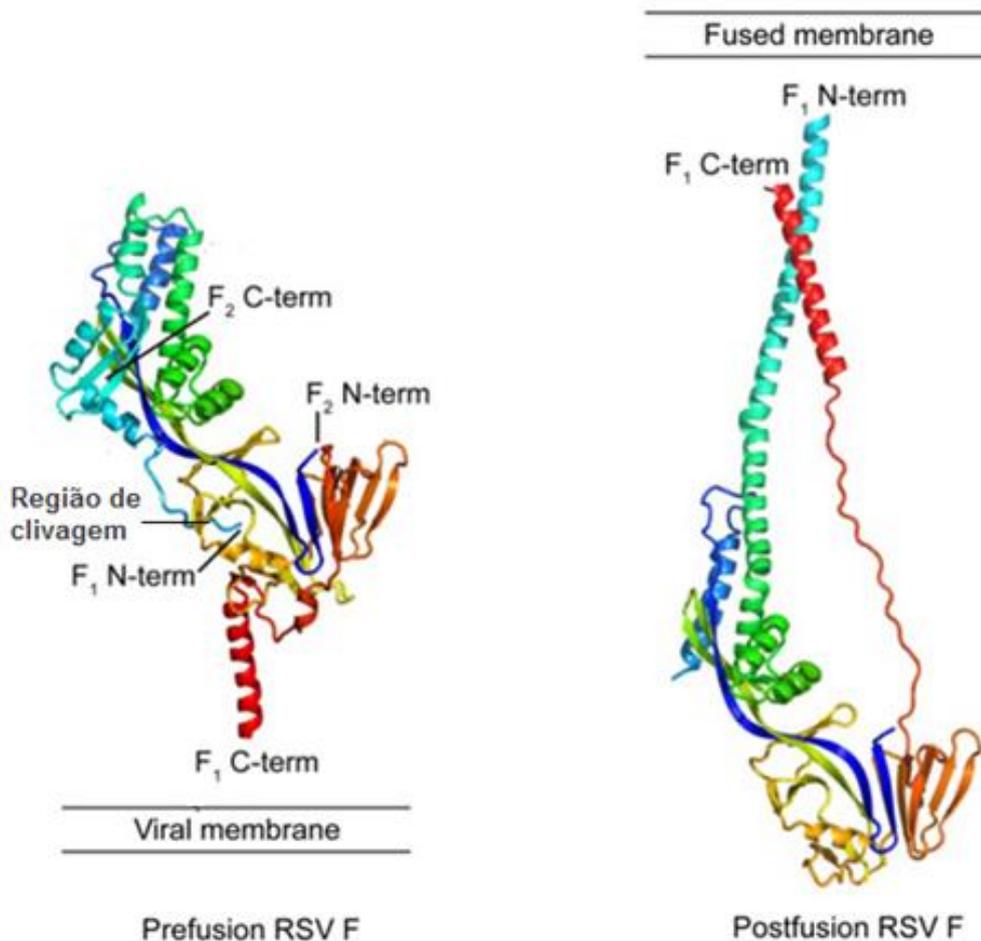


Figura 3. Estrutura monomérica da proteína F na conformação pré e pós-fusão. Regiões terminais de F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> estão destacadas na imagem (Adaptada de McLellan et al., 2013).

Estudos recentes demonstraram que a superfície do vírus não está restrita à apenas uma conformação da proteína F, sendo esta encontrada em ambos os estados conformacionais, de pré e pós-fusão, compartilhando cerca de 50% da superfície viral (Figura 4) (Liljeroos et al., 2013; Killikelly, Kanekiyo e Graham, 2016).

Dessa forma, existem três estados conformacionais para a proteína F: um estado nativo, formado antes da clivagem; um estado intermediário em “*pre-hairpin*”, formado após a clivagem proteolítica, e o estado pós-fusão, em que duas regiões “*heptad-repeat*” formam um conjunto de seis alfa-hélices (Zhu et al., 2003).

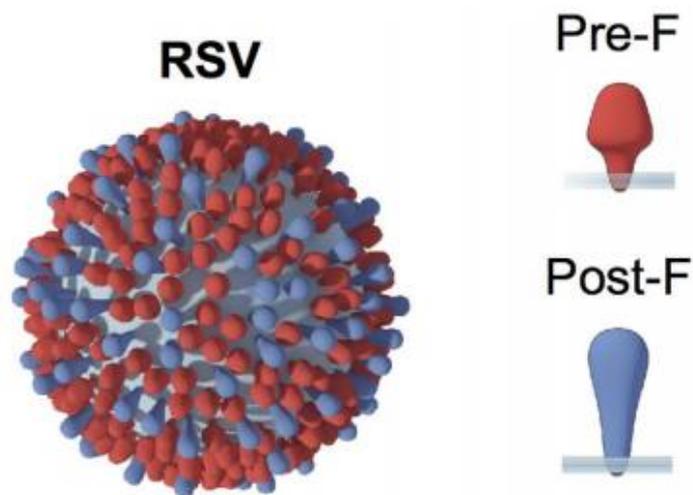


Figure 4. Partículas de Vírus Sincicial Respiratório exibe proteína F em sua superfície nas conformações pré e pós-fusão. (Adaptado de Killikelly, Kanekiyo e Graham, 2016).

#### 1.1.4 Profilaxia e Tratamento

A infecção por hRSV representa uma grave ameaça à saúde global por sua ampla distribuição e prevalência, além de gerar uma grande carga econômica para pacientes, governos e sistemas de saúde. Apesar disso, não foram desenvolvidos até o momento agentes antivirais efetivos e específicos para sua infecção. Como não existe um tratamento específico para a doença causada pelo hRSV, este é feito primariamente através de medidas de alívio dos sintomas e de manutenção do estado geral, exceto em pacientes de risco (Yu et al., 2006).

Muitos estudos tem sido realizados atualmente visando a neutralização da infecção viral por hRSV, pois o uso de medicamentos como broncodilatadores e corticosteroides são ineficientes em diminuir a taxa de hospitalização e mortalidade (Flores et al., 1997; Dobson et al., 1998; American Academic 2006; Corneli et al., 2007). Os principais alvos dos estudos são as glicoproteínas F e G, devido sua importância para a infecção viral. O mecanismo que mais tem sido estudado é a neutralização destas proteínas por anticorpos específicos que podem se ligar a importantes sítios ativos da proteína viral, alterando sua atividade ou melhorando sua opsonização (Choi et al., 2012; Jorquera et al., 2015). A ligação do anticorpo também pode reduzir o contato das proteínas G e F com a membrana celular, dificultando ou impedindo a adesão e a fusão do hRSV com a célula ou ainda interferir indiretamente na sua ação inativando o vírus (McLellan et al., 2010).

A ribavirina, um nucleosídeo análogo que inibe a síntese de ácido nucleico viral, é um fármaco antiviral licenciado e que é utilizado como tratamento para o hRSV. Este tratamento no entanto, possui risco mutagênico, sendo utilizado praticamente apenas em adultos imunocomprometidos (Ventre e Randolph, 2007).

Dentre as medidas de prevenção disponíveis e recomendadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) está a administração dos anticorpos Palivizumab ou Motavizumab, que se ligam à proteína F do hRSV (Yu et al., 2006).

O Palivizumab (Synagis) é um anticorpo monoclonal do tipo IgG1, humanizado a partir de ratos, produzido por tecnologia de DNA recombinante. É composto por 95% de sequências de aminoácidos humano e 5% de murino, sendo expresso em linhagem celular estável de mieloma murino (Johnson et al., 1997; Wu et al., 2008).

Motavizumab (Numax) é um anticorpo monoclonal derivado do Palivizumab, produzido e otimizado através da técnica de maturação de afinidade *in vitro*, processo que eleva a taxa mutacional em determinadas partes do DNA, levando a uma seleção clonal e aumento da afinidade. Difere do Palivizumab em 13 aminoácidos, tendo sido aprovado pelo FDA em 2008 (Wu et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstram que Motavizumab neutraliza a replicação do hRSV em cultura celular quando o vírus é pré-tratado com este anticorpo. Ambos os anticorpos tem como alvo um epítopo no sítio II (também denominado sítio A) altamente conservado, da proteína F, neutralizando e inibindo sua atividade de fusão (Huang et al., 2010).

No entanto o custo dessa medida é muito elevado e vem sendo usado apenas na imunização de crianças de alto risco. A eficácia desses tratamentos também dependem do diagnóstico precoce da infecção por hRSV, o que geralmente não é possível devido à similaridade sintomática com outras infecções, e o custo elevado do tratamento e seu risco mutagênico desencoraja seu uso (Yu et al., 2006).

A amplificação do espectro de estudos para encontrar novos compostos e/ou 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, creches e escolas primárias. Portanto, o atual desafio é produzir uma vacina e tratamentos eficientes e de ampla proteção, que sejam capazes de inibir a infecção ou de induzir a imunidade para as duas cepas de hRSV (A e B),

principalmente em idosos, crianças e recém-nascidos, devido ao alto índice de reinfeção e à imaturidade do sistema imunológico.

## **1.2. Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs)**

### **1.2.1. Imunidade Inata e o hRSV**

Durante a infecção por hRSV há o envolvimento de células epiteliais, células do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo (Bueno et al., 2008), sendo as células epiteliais o alvo inicial do vírus, alterando a expressão de receptores da membrana plasmática envolvidos na ativação da resposta imune. Estudos demonstraram que o hRSV induz a expressão de Toll-like receptor 3 (TLR3) e Proteína Quinase R nas células epiteliais, aumentando a responsividade destas células frente à infecção e levando à ativação da resposta imune inata (Groskreutz, 2006).

Células epiteliais das vias aéreas, infectadas *in vitro* com hRSV, produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação e o recrutamento de células do sistema imune, como neutrófilos (através da IL-8), monócitos (através de MCP-1, proteína quimiotática de monócitos 1), células T de memória (através de RANTES ou CCL5) e eosinófilos (através de eotaxina) (Olszewska-Pazdrak, 1998).

O hRSV também aumenta a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) em células endoteliais durante uma infecção *in vitro*, causando transmigração elevada de neutrófilos para o local (Arnold e König, 2005; Rzepka et al., 2012). Além disso, outro estudo demonstrou que no lavado nasal de crianças com bronquiolite causada por hRSV há altos níveis de IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF e MIP-1 $\beta$  (Bennett et al., 2007).

Neutrófilos e seus produtos foram encontrados nas vias aéreas de pacientes infectados por hRSV que desenvolveram doença pulmonar devido à infecção viral (Teran et al., 1997; Van Schaik, 1998), e números muito elevados de neutrófilos foram observados nas vias aéreas de crianças com bronquiolite aguda, o que parece ser consequência tanto do recrutamento, quanto da sobrevivência prolongada deste tipo celular no interior das vias respiratórias infantis (Noah et al., 2002).

Neutrófilos humanos incubados com hRSV produzem IL-8, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  e liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) a partir de seus grânulos (Jaovisidha, 1999). Emboriadou e colaboradores demonstraram que há também um nível elevado de elastase neutrofílica (enzima presente nos grânulos dos neutrófilos) no trato respiratório de pacientes com bronquiolite causada por hRSV (Emboriadou et al., 2007).

### **1.2.2. NETs e o Vírus Sincicial Respiratório**

Os neutrófilos são células efetoras essenciais do sistema imune inato, constituindo cerca de (70%) de todas as células brancas do ser humano. Essas células podem ser encontradas na corrente sanguínea, onde vivem de 6 a 8 horas, e no tecido, onde podem viver até 7 dias. (Naussef e Borregaard, 2014). Durante uma infecção estas células são umas das primeiras a serem recrutadas para os sítios inflamatórios, onde elas têm um papel crucial na eliminação do microrganismo invasor e na produção de citocinas, agindo como primeira linha de defesa imune do corpo, juntamente com as barreiras físicas (Jenne e Kubes, 2015).

O mecanismo clássico de eliminação de microrganismos pelos neutrófilos é a fagocitose. Após o reconhecimento por receptores de superfície dos neutrófilos, os patógenos são engolfados em fagossomos e expostos a peptídeos antimicrobianos, enzimas e espécies reativas do oxigênio (ROS), que causam a morte do microrganismo invasor. Após a fagocitose, muitos neutrófilos sofrem apoptose (Coxon et al., 1996; Zhang et al., 2003) e são eficientemente removidos por macrófagos, prevenindo a liberação de proteínas neutrofílicas que podem causar danos severos no tecido (Serhan e Savill, 2005; Haslett, 1997).

Neutrófilos apoptóticos apresentam morfologia clássica, na qual ocorre condensação da cromatina, fragmentação do DNA sem ruptura do envelope nuclear, vacuolização do citoplasma, sendo que as organelas citoplasmáticas permanecem intactas, e exposição de fosfatidilserina. Neutrófilos também podem sofrer morte celular por necrose, com perda de estrutura nuclear e da integridade da membrana plasmática (Thompson, 1999; Kerr, Wyllie e Currie, 1972).

Em 2004 foi descrito um outro mecanismo de eliminação de patógenos pelos neutrófilos o qual envolve a formação de estruturas denominadas *neutrophil extracellular traps* (NETs). As NETs são estruturas extracelulares que têm DNA

como principal componente estrutural e associadas ao DNA estão histonas e proteínas granulares e nucleares, entre as quais algumas possuem atividade microbicida, como elastase, mieloperoxidase, catepsina G, lactoferrina, gelatinase, entre outras, sendo capazes de destruir fatores de virulência. (Brinkmann et al., 2004; Bainton, 1999; Borregaard e Cowland. 1997; Mesa e Vasquez, 2013) (Figura 5).

O DNA e as histonas presente no núcleo do neutrófilo, também possuem atividade bactericida. O DNA age como um agente quelante de cátions devido ao seu esqueleto fosfodiéster, tornando-o capaz de romper membranas internas e externas de bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa* (Halverson et al., 2015; Mulcahy, Charron-Mazenod e Lewenza, 2008). A atividade microbicida das histonas tem sido observada não só para bactérias, mas também para parasitas. Wang et al. observou que H2A e H2B reduz em até 50% a replicação de promastigotas de *Leishmania* spp. (Wang et al., 2011).

A atividade microbicida dos componentes das NETs e sua rede composta de DNA torna estas estruturas capazes de capturar e matar diversos patógenos (Brinkmann et al., 2004; Urban et al., 2006). A produção de NETs é dependente de alguns receptores da família Fc e receptores do tipo Toll (TLR) (Urban et al., 2006; Sousa-Rocha et al., 2015).

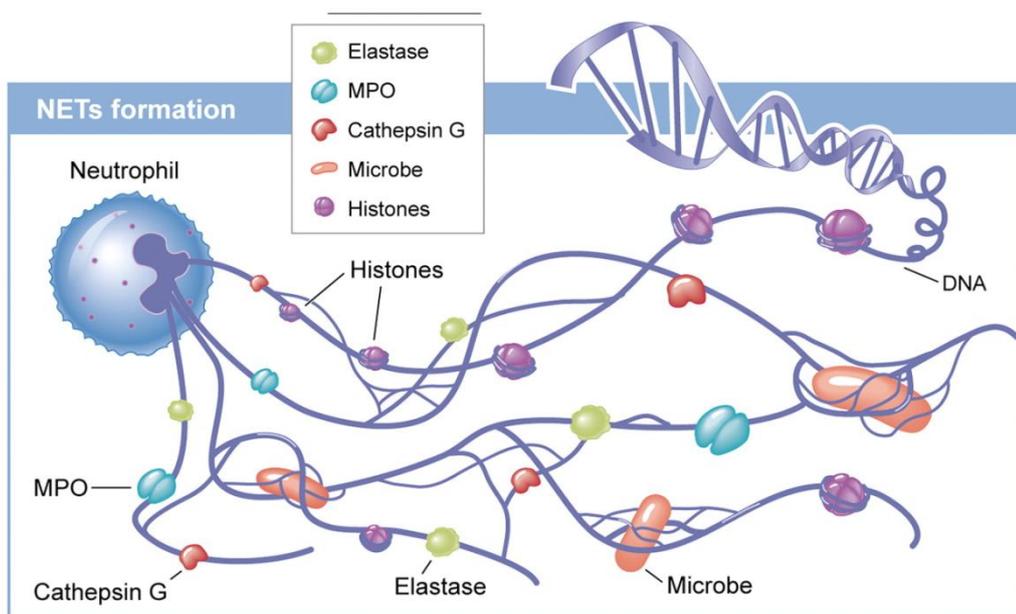


Figura 5. Esquema demonstrando algumas das principais estruturas presentes nas NETs. (Adaptada de Miyata e Fan, 2012)

O processo de formação das NETs, denominado NETose, é um processo ativo que envolve o rearranjo da arquitetura nuclear, citoplasmática e granular do neutrófilo (Brinkmann e Zychlinsky, 2007). Até o momento três modelos de NETose são conhecidos. A NETose suicida, com duração de 2-4 horas, é o melhor modelo descrito, embora seu processo molecular ainda não seja totalmente compreendido (Pilszczek et al., 2015; Al-Khafaji et al., 2016). Este processo é dependente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocorre perda das membranas intracelulares e mistura dos componentes nucleares e citoplasmático seguida de desintegração da membrana plasmática e liberação das NETs (Vorobjeva e Pinegin, 2014).

A NETose vital, onde os neutrófilos liberam NETs sem exibir perda da membrana nuclear ou plasmática, ocorre entre 5-60 minutos e é independente da produção de ROS. A liberação do DNA nuclear ocorre através de três mudanças morfológicas: crescimento do envelope nuclear e liberação de vesículas, descondensação nuclear e rompimento do envelope nuclear. Após a liberação das NETs esses neutrófilos ainda são capazes de fagocitar patógenos e sua vida útil não é afetada pela perda de DNA (Branitzki-Heinemann et al., 2016; Douda et al., 2015; Yipp e Kubes, 2013). O último modelo descrito é outro tipo de NETose vital, o qual é dependente de ROS e ocorre a liberação de DNA mitocondrial ao invés de DNA nuclear. Este processo resulta na liberação de NETs em 15 minutos, através do reconhecimento do fator do complemento C5a ou lipopolissacarídeo (LPS) (Yousefi et al., 2009).

Estudos demonstram que o processo de NETose é diferente dos processos de apoptose e necrose, por apresentar características morfológicas distintas. Diferentemente da apoptose, durante a formação das NETs não há exposição de fosfatidilserina na membrana celular ou fragmentação de DNA, bem como perda da permeabilidade celular, características clássicas de necrose e apoptose (Fuchs et al., 2007; Souza et al., 2015).

Neutrófilos sob estímulos de diferentes origens (IL-8, LPS, PMA, bactérias, fungos ou plaquetas ativadas) iniciam um processo ativo, levando à formação das NETs e podendo ocasionar sua morte. Alguns estímulos, como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), induzem NETs dependentes da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), NETose suicida, através do complexo multienzimático NADPH

oxidase (Guimarães-Costa et al., 2011; Almyroudís et al., 2013; Keshari et al., 2013). *In vivo* a formação das NETs é dependente da enzima PAD4, responsável pela citrulinização das histonas, com consequente descondensação do DNA, levando à formação das NETs (Wang et al., 2009).

Neutrófilos são rapidamente recrutados para sítios da infecção viral, mas seu papel durante a infecção ainda é confuso. Em alguns estudos, utilizando vírus da *Influenza*, neutrófilos demonstraram ser essenciais para limitar a replicação viral, enquanto em outros, o recrutamento de neutrófilos resultou em aumento da morte celular epitelial (Drescher e Bai, 2013; Thomas et al., 2009; Pang e Iwasaki, 2011). Até o momento, a interação de neutrófilos com os vírus é bem menos caracterizada do que aquelas envolvendo bactérias ou fungos, especialmente no que diz respeito à geração das NETs.

Um estudo de 2010 utilizando gatos infectados com o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) demonstrou que a produção de NETs pode ser modulada pela infecção viral (Wardini et al., 2010). Saitoh e colaboradores demonstraram que durante uma infecção por HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo-1), há envolvimento de neutrófilos na resposta imunológica do hospedeiro, e por microscopia eletrônica detectaram partículas do vírion capturadas pelas NETs. Além disso, foi constatado que a capacidade de infecção do HIV-1 diminuía significativamente após ser capturado pelas NETs, demonstrando seu papel na inativação das partículas virais (Saitoh et al., 2012). Ainda, outro estudo demonstrou uma alta presença de NETs em pacientes com inflamação pulmonar durante a infecção pelo vírus H1N1 (Influenza A) (Hemmers et al., 2011).

Recentemente foi demonstrada a capacidade do vírus hRSV em induzir a liberação de NETs por neutrófilos humanos. Neste estudo, a glicoproteína de fusão F do vírus foi um estímulo capaz de induzir NETs assim como os estímulos por PMA e LPS (estímulos indutores de NETs). Foi demonstrado também que as NETs apresentavam DNA como componente principal, além de mieloperoxidase e elastase neutrofílica (Funchal et al., 2015). Estes achados refletem os achados dos estudos com pacientes infectados por hRSV, que apresentavam elevada quantidade de elastase neutrofílica no trato respiratório (Embriado et al., 2007).

Além da sua função microbicida, as NETose também possui um lado nocivo, podendo causar graves efeitos patológicos, pois a citotoxicidade das NETs pode ser

prejudicial para o hospedeiro se sua liberação for descontrolada. Formação excessiva de NETs está ligada à várias patologias, incluindo vasculite, sepse, doenças autoimunes e câncer . As NETs também induzem ativação plaquetária, a qual pode levar à trombooses e injúrias vasculares. (REF B. Amulic and G. Hayes, “Neutrophil extracellular traps,” *Current Biology*, vol. 21, no. 9, pp. R297–R298, 2011.)

A liberação das NETs também tem sido relacionadas com o desenvolvimento e complicações de doenças respiratórias. Quando excessivamente recrutados para o tecido pulmonar em resposta a uma infecção, os neutrófilos podem romper a microcirculação e induzir ocorrência de mais NETose nos alvéolos pulmonares. Pacientes com disfunção pulmonar mostram níveis mais elevados de DNA extracelular do que pacientes com doenças pulmonares moderadas, demonstrando que as NETs participam da obstrução do fluxo aéreo e ajudar a perpetuar as repostas inflamatórias crônicas (Dworski et al., 2011; Pedersen et al., 2015).

Em conjunto, os resultados obtidos por estes estudos e vários outros, demonstram um importante papel dos neutrófilos frente às infecções virais, inclusive à infecção pelo hRSV, e que estas também são capazes de induzir a geração de NETs. Apesar destes resultados e vários outros descritos na literatura, ainda há muito para ser estudado e caracterizado em relação à infecção viral e sua relação com os neutrófilos e as NETs. Além disso, ainda não está totalmente claro o papel das NETs frente à infecção por hRSV, tornando importante a investigação do potencial e da forma de interação dessas estruturas com o vírus e se estas teriam algum papel na inibição e/ou eliminação viral, podendo possuir assim uma promissora atividade antiviral.

Algumas substâncias apresentam intensa atividade antiviral, porém, também podem exercer concomitantemente efeito citotóxico. O Índice de Seletividade (IS) indica o quão promissor é a atividade antiviral de determinado composto, pela razão entre dois outros índices (CC50 – efeito citotóxico e CE50 – ação antiviral). Determina-se que compostos que apresentem  $IS \geq 4$  possuem atividade antiviral promissora. Portanto, a proposta do presente trabalho foi estimular e isolar NETs a partir de neutrófilos humanos para avaliar sua atividade anti-hRSV por ensaios *in vitro*, e através de ensaios *in silico* analisar possíveis interações de importantes componentes das NETs, elastase e histonas, com a proteína F, essencial para a

atividade de fusão do vírus. Assim, este estudo visa responder se as NETs exercem ação antiviral contra o hRSV e qual o índice de seletividade das NETs em relação ao vírus, além de avaliar se uma possível inibição viral pelas NETs se daria através da sua ação direta sobre a partícula viral e de que forma essa interação estaria acontecendo.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral:**

Avaliar a interferência das NETs durante a infecção *in vitro* por hRSV.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- a) Gerar e analisar NETs induzidas por PMA quanto ao seu perfil eletroforético (DNA e proteínas);
- b) Analisar a citotoxicidade das NETs sob células HEp-2 utilizando a técnica de viabilidade celular por ensaio de adição de MTT;
- c) Determinar o índice de seletividade das NETs em relação ao hRSV em protocolo virucida;
- d) Avaliar possíveis interações entre histonas/elastase e proteína F do hRSV através de *docking molecular*.

### **3. Materiais e Métodos**

Todos os procedimentos passíveis de contaminação foram realizados em câmaras de fluxo laminar, com soluções, vidrarias e produtos esterilizados por autoclavação ou filtração.

#### **3.1. Declaração de ética**

Os procedimentos experimentais utilizando sangue humano foram aprovados pelo Comitê de Ética local em Pesquisa Humana da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – FCL UNESP (42048315.5.0000.5401; <http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/login.jsf>). Consentimento informado por escrito, sugerido e aprovado pelo Comitê, foi obtido a partir de cada participante antes de iniciar os procedimentos de investigação.

#### **3.2. Cultura Celular**

Células HEp-2 (carcinoma de orofaringe) obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Glass Works, Nova York, NY, USA) incubadas em estufa umedecida à 37°C e 5% de CO<sup>2</sup> e meio de cultura DMEM F12 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil,) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). A escolha das células HEp-2 foi baseada na literatura por serem células oriundas do trato respiratório humano e por serem permissivas à infecção e replicação do vírus hRSV (Grupta et al., 1996; Srinivasakumar, Ogra e Flanagan, 1991).

#### **3.3. Estoque viral**

O vírus hRSV cepa Long, cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Professor Livre-docente de Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -

USP) foi amplificado em culturas de células HEp-2. Os estoques virais foram preparados em meio de cultivo DMEM F12 incompleto (não acrescido de SFB). Após a coleta do estoque viral, as alíquotas foram congeladas em DMEM F12 acrescido de trealose 10% e mantidas em freezer a -80°C até o momento do uso (Gupta et al., 1996). O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimm-Breschkin, 2004 e confirmado pelo ensaio de TCDI<sub>50</sub> (Rasmussem et al., 2011).

### **3.4. Purificação de neutrófilos humanos**

Neutrófilos humanos foram isolados seguindo recomendações do fabricante e estimulados de acordo com a metodologia descrita por Brinkmann et.al., 2010 com modificações (Najmeh et al., 2015; Saffarzadeh et al., 2012). Partindo do sangue periférico de voluntários declarados saudáveis, 10ml de sangue foram obtidos utilizando os tubos de coleta de sangue de sódio Na<sup>+</sup> heparina Vacutainer de plástico (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Meio de separação Histopaque 1077 (3ml) foi cuidadosamente colocado sobre Histopaque 1119 (3ml) (Sigma-Aldrich) e de posse da amostra sanguínea, esta foi cuidadosamente adicionada sobre o meio. As amostras foram centrifugadas a 700xg, durante 30 minutos à 25° C. O plasma e o anel de mononucleares foram desprezados em solução de hipoclorito de sódio (5%) e o anel de neutrófilos foi coletado e lavado em DMEM F12 à 800xg por 5 minutos. O sedimento de células foi ressuspensão em 1ml de meio DMEM F12. Contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany), partindo da suspensão diluída 20 vezes em solução de Turk (20ml ácido acético glacial, 0.5g azul de metileno e água para 1L). Os neutrófilos foram então estimulados para a geração de NETs.

### **3.5. Estimulação de neutrófilos humanos para geração das NETs.**

NETs foram geradas seguindo modificações no procedimento descrito por Brinkmann et.al., 2010 com modificações (Najmeh et al., 2015; Saffarzadeh et al., 2012). Neutrófilos isolados e diluídos em DMEM F12 foram adicionados em uma placa de 6 poços (1.8x10<sup>6</sup>/poço) na presença de PMA à 50nM. A placa foi incubada

por 3 horas, à 37°C em estufa umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi descartado e as NETs foram coletadas e incubadas em banho-maria à 40°C por 24 horas. As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação à 800xg por 5 minutos e o sobrenadante armazenado em freezer -25°C. Para quantificação do DNA presente nas amostras foi utilizado o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Inc, Grand Island, NY, USA) através do kit PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen).

### **3.6. Visualização das NETs por Microscopia de fluorescência**

Neutrófilos isolados foram adicionados em uma placa de 24 poços (2x10<sup>5</sup>/poço), tratada com poli-L-lisina 0.01%. Posteriormente, as células foram estimuladas na presença de meio DMEM F12 incompleto acrescido ou não de PMA (50nM) por 3 horas, à 37 °C em estufa umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas foram montadas em ProLong Gold contendo DAPI (Invitrogen). As amostras foram então submetidas à captura de imagens em microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse Ti acoplado em câmera digital Nikon Sight.

### **3.7. Análise do perfil eletroforético das NETs**

#### **3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Para análise do perfil eletroforético proteico, gel de poliacrilamida 12% e 20% foram preparados de acordo com o protocolo de Green e Sambrook, 2012. A eletroforese foi iniciada com a inserção do tampão na cuba e em cada poço do gel foi colocado os respectivos volumes de NETs geradas anteriormente: 12µL, 25µL e 50µL de NET 66.4µg/ml ou 76.8µg/ml (quantidade de DNA na amostra) foram aplicados em géis de 12% ou 20%, respectivamente. No poço padrão foi adicionado Marcador de proteínas Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc, 205 CA, USA). Inicialmente a voltagem foi mantida em 80 V até que as proteínas migrassem pelo gel de empilhamento. Ao dar entrada no gel de resolução, a voltagem foi aumentada para 100 V. Ao final da corrida, os géis foram corados com Azul de Coomassie (24 horas) e Nitrato de Prata (Anexo 1). O gel de poliacrilamida de maior densidade (20%), foi preparado para a análise de proteínas

de menores tamanhos, que não foram possíveis de serem observadas no gel de menor densidade (12%).

### **3.7.2. Eletroforese em gel de agarose**

Para análise do perfil eletroforético do DNA das NETs geradas anteriormente, alíquotas de 134µg/ml foram centrifugadas à 10,000 rpm por 10 minutos e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1.5% (Anexo 2). DNA ladder de 1kb foi usado como padrão de peso molecular (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). O gel foi corado com GelRed (1:10,000) (Biotium, Hayward, CA, USA) e as imagens capturadas em transluminador de ultravioleta.

## **3.8. Avaliação de atividade enzimática**

### **3.8.1. Avaliação da atividade de elastase**

Em placa de 96 poços, acrescida com DMEM F12 (100µl/poço), foi adicionado 50µl/poço de NETs que foram incubadas em banho-maria por 24 horas à 40° C (*vide etapa 3.5.*) ou 50µl/poço de NETs que não passaram por essa etapa de incubação e foram apenas estocadas a -25 °C. Em triplicatas, em cada condição foi adicionado 1mM de substrato de elastase (N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide, Sigma). Após 30 minutos de incubação em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, a absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), com comprimento de onda de 405nm. As NETs utilizadas em cada condição, incubada a 40 °C ou não, foram quantificadas em relação ao seu DNA para tornar os valores de absorbância equivalentes em cada amostra. A degradação do substrato é diretamente proporcional a atividade da elastase, possibilitando inferir sua atividade a partir da absorbância mensurada. NETs que não passaram pela etapa de incubação foram consideradas com 100% de atividade de elastase.

### **3.8.2. Avaliação da atividade de mieloperoxidase**

Em placa de 96 poços, foi adicionado 50µl/poço de NETs que foram incubadas em banho-maria por 24 horas à 40 °C (*vide etapa 3.5.*), 50µl/poço de NETs incubadas à 37 °C ou 50µl/poço de NETs que não passaram por essa etapa de incubação e foram apenas estocadas a -25 °C. Em triplicatas, em cada condição foi adicionado 100µl/poço de substrato 3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) . Após 1 hora de incubação em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, foi adicionado 100µl/poço de solução stopper para interromper a reação, e então a absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), com comprimento de onda de 405nm. As NETs utilizadas em cada condição, incubada a 40 °C, 37 °C ou não incubadas, foram quantificadas em relação ao seu conteúdo de DNA para tornar os valores de absorbância equivalentes em cada amostra. A degradação do substrato é diretamente proporcional a atividade da mieloperoxidase, possibilitando inferir sua atividade a partir da absorbância mensurada. NETs que não passaram pela etapa de incubação foram consideradas com 100% de atividade de mieloperoxidase.

### **3.9. Ensaio colorimétrico de viabilidade por adição do sal de MTT**

A adição do sal de MTT [1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan] em nossas culturas foi feita seguindo as recomendações do fabricante (Sigma). Após os respectivos tratamentos em placas de 96 poços, o meio de cultura foi substituído por 100µl de solução de MTT (0.5mg/ml diluído em DMEM F12) e a placa incubada por 2 horas. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por 50µl de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma) para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), com comprimento de onda de 560nm. A metabolização do sal é diretamente proporcional à taxa metabólica, possibilitando assim inferir a viabilidade celular a partir da absorbância mensurada (Equação 1).

Equação (1)

$$Viabilidade\ Celular = \frac{Abs_{teste} * 100}{Abs_{controle}}$$

### **3.10. Determinação da CC50 das NETs em células HEp-2**

Células HEp-2 na presença de meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10% foram plaqueadas em placa de 96 poços ( $5 \times 10^4$ /poço) e incubadas por 24 horas para que atingissem confluência  $\geq 80\%$ . A monocamada recebeu diferentes concentrações de NETs (0-67 $\mu$ g/ml) diluídas em DMEM F12 livre de SFB (200 $\mu$ L/poço). No segundo dia após a adição das NETs, todos os poços da cultura foram acrescidos de 100 $\mu$ L de DMEM-F12 livre de SFB com o intuito de manter os nutrientes celulares e a validade dos antibióticos. A cultura foi mantida por 4 dias em uma estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade das células HEp-2 foi avaliada no quarto dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, e sua absorbância foi lida à 560nm em aparelho de espectrofotometria. Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo foram consideradas como 100% viáveis. Desta forma, os valores de CC50 (concentração citotóxica que reduz em 50% a viabilidade celular) foram obtidos por análise de regressão dos percentuais referentes às diferentes concentrações das amostras testadas. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular como 100% de viabilidade.

### **3.11. Avaliação da ação anti-hRSV das NETs**

Nesse estudo a abordagem metodológica virucida foi utilizada para avaliação antiviral das NETs. Para os ensaios, células HEp-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$ /poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10%.

#### **3.11.1. Ensaio virucida**

Realizado como descrito por Petricevich e Mendonca, 2003, com algumas modificações, as suspensões de hRSV, (MOI 1, 0.5 e 0.1, *Multiplicity of infection*), foram incubadas por 1 hora à 4 °C na presença de diferentes concentrações de NETs (0-64 $\mu$ g/ml). Ao final da incubação, as alíquotas virais tratadas com NETs

foram adicionadas nas monocamadas de células HEp-2 e então incubadas com as células por um período de 2 horas à 37 °C, em seguida foi adicionado ao sobrenadante meio DMEM-F12 até completar o volume final de 100µL. A placa foi incubada por quatro dias em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. No segundo dia após a infecção, todos os poços da cultura foram acrescidos de 100µL de DMEM-F12 livre de SFB com o intuito de manter os nutrientes celulares e a validade dos antibióticos

### 3.11.2. Análise do ensaio virucida

Os ensaios tiveram por amostras controle (i) células não tratadas e não infectadas e (ii) células não tratadas que foram infectadas com o vírus. A viabilidade celular foi avaliada no quarto dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, e a leitura de absorbância foi realizada em aparelho de espectrofotometria a 560nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular não tratado e não infectado como 100% de viabilidade. A porcentagem de proteção obtida em cada tratamento foi calculada como se segue:

$$\text{Equação (2)} \quad \textit{Proteção Celular} = \frac{DO_{AT} * 100}{DO_{CC100}}$$

Onde:

DO é a densidade óptica após leitura do sal de MTT em 560 nm;

DO<sub>AT</sub> é a densidade óptica obtida para cada uma das amostras-teste - DO<sub>CCV</sub> (densidade óptica do controle viral) e

DO<sub>CC100</sub> é DO<sub>CC</sub> – DO<sub>CV</sub> (densidade óptica do controle celular – densidade óptica do controle viral).

### 3.12. Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) fornece indício do quão promissora é a atividade antiviral da amostra testada, relacionando sua CC50 com a CE50 [19].

$$\text{Equação (3)} \quad \text{Índice de Seletividade (IS)} = \frac{CC50}{CE50}$$

Os valores de CE50 correspondem à concentração da amostra teste necessária para resultar em 50% de proteção celular e estes foram determinados na *etapa 3.11*.

### **3.13. Análise Estatística**

Os dados experimentais foram processados com o auxílio dos softwares Microsoft Excel e Graphpad Prism 6 e avaliados por análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Foi considerado um nível de significância de  $p \leq 0.05$ . As repetições de cada experimento foi indicada em cada figura respectiva.

### **3.14. Análises de Bioinformática**

#### **3.14.1. Docking molecular**

As estruturas tridimensionais da elastase neutrofílica humana (PDB ID 3Q76), histona (complexadas em nucleossomo) (PDB ID 3AFA) e da proteína F pré-fusão (PDB ID 4JHW) e pós-fusão (PDB ID 3RRR) foram obtidas através do banco de dados Protein Data Bank. A estrutura tridimensional do anticorpo motavizumab (PDB ID 3IXT) também foi utilizada, como forma de comparação entre os complexos formados. A estrutura monomérica da proteína F, obtida pelo Protein Data Bank, foi utilizada para gerar a sua estrutura trimérica, utilizando o programa online Symmdock (Duhovny et al., 2002).

Os procedimentos de *docking molecular* foram realizados pelo programa de plataforma online PatchDock (Duhovny et al., 2002) e o dados gerados foram refinados pelo servidor online FireDock (Mashiach et al., 2008; Andrusier et al.,

2007). Os parâmetros para os *dockings* foram mantidos padrão, com um valor de RMSD = 4, recomendado pelo servidor para *dockings* de proteína-proteína. Este valor é utilizado pelo programa para formar os clusters (agrupamentos de estruturas com RMSD semelhantes) dos melhores resultados. Os complexos e os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software de interface gráfica PyMOL, assim como as imagens geradas.

#### 4. Resultados e Discussão

As NETs são descritas como moléculas de DNA descondensado conjugadas com proteínas nucleares e granulares, que são liberadas pelos neutrófilos sob diferentes estímulos, como IL-8, IFN- $\gamma$ , PMA, LPS, entre outros (Brinkmann et al., 2004). Estas estruturas apresentam atividade microbicida sobre diferentes microrganismos, além de poder aprisionar o patógeno e impedir sua replicação (Hemmers et al., 2011; Saitoh et al., 2012; Wardini et al., 2010).

A maioria dos estudos para identificar a formação de NETs utiliza PMA, um potente ativador sintético da família de enzimas PKC, para estimular neutrófilos isolados e induzir a formação das redes extracelulares (Karlsson e Dahlgren, 2002). Neste trabalho, NETs foram geradas sob o estímulo de PMA na concentração de 50nM. A geração das NETs foi realizada na ausência de soro fetal bovino para que posteriormente sua atividade anti-hRSV fosse avaliada. A ausência do soro se faz necessária em virtude da presença de DNase em sua composição, as quais poderiam degradar as NETs comprometendo assim sua ação (Von Köckritz-Blickwede, 2009). As NETs geradas após estímulo com PMA foram avaliadas morfológicamente, por microscopia de fluorescência, e quanto ao seu perfil eletroforético, em géis de agarose e de poliacrilamida.

A análise visual por microscopia de fluorescência mostrou que neutrófilos não estimulados não apresentaram liberação de NETs, como o esperado, enquanto neutrófilos estimulados com PMA por 3 horas apresentaram estruturas extracelulares coradas por DAPI, um intercalante fluorescente de DNA (Figura 6). Esses dados são compatíveis com aqueles descritos na literatura (Funchal et al., 2005).

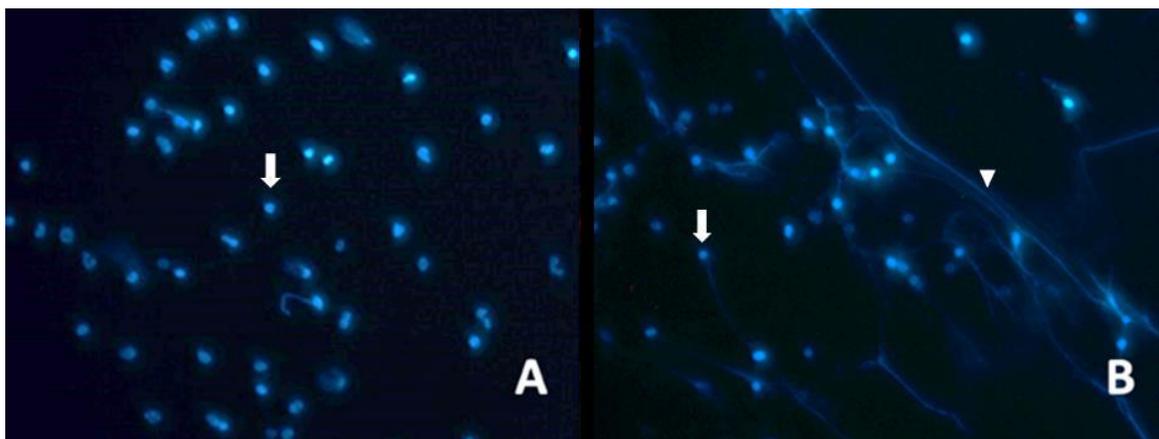


Figura 6. NETs induzidas pela estimulação por PMA. Neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) (seta branca) foram incubados (3 horas) apenas com meio DMEM-F12 livre de SFB (A), como controle negativo ou com PMA 50nM (B). As lamínulas foram montadas em Prolong Gold contendo DAPI e as imagens capturadas em câmera acoplada a um microscópio invertido de fluorescência. As NETs podem ser observadas pela coloração azul, como fibras longas extracelulares (ponta da seta branca). As imagens são representativas de dois ensaios independentes realizados em triplicata.

O DNA presente nas NETs é descondensado, íntegro e possui forte carga negativa, podendo aprisionar patógenos e impedir sua disseminação, além de possuir alta ação microbicida devido à sua capacidade de romper a integridade de membrana e lisar células bacterianas (Halverson et al., 2015). Essa atração eletrostática do DNA presente nas NETs é capaz de imobilizar inclusive partículas virais e impedir mecanicamente sua disseminação (Saitoh et al., 2012). Na análise do perfil eletroforético de DNA, através de gel de agarose, observamos a presença de fragmentos longos e homogêneos de DNA, maiores que 10,000 pares de base (Figura 7A). O tamanho dos fragmentos de DNA pode influenciar na captura do patógeno já que fragmentos muito curtos podem apresentar uma menor capacidade física em envolver o microrganismo e fragmentos maiores teriam um favorecimento espacial em capturar o vírus.

Dentre as proteínas descritas como componentes das NETs podemos citar as histonas, correspondendo a mais de 70% das proteínas presentes, elastase, mieloperoxidase, catepsina G, defensinas, lactoferrina, lisozima, colagenase, proteinase 3, dentre outras (Najmeh et al., 2015; Manda et al., 2014). Como forma de avaliar o perfil das proteínas presentes nas soluções de NETs geradas neste estudo, estas foram submetidas à análise em gel de poliacrilamida 12% (Figura 7B e

C). As colorações com Azul de Comassie e Nitrato de Prata evidenciaram 3 proteínas de pesos moleculares diferentes. Duas dessas proteínas possuem peso molecular entre 75 e 50 kDa, e uma delas possui peso molecular próximo de 30 kDa. A análise do peso molecular sugere que a identidade destas proteínas seja Elastase (28.5 kDa), Catepsina G (28.8 kDa) e Mieloperoxidase (73.8-87.2 kDa).

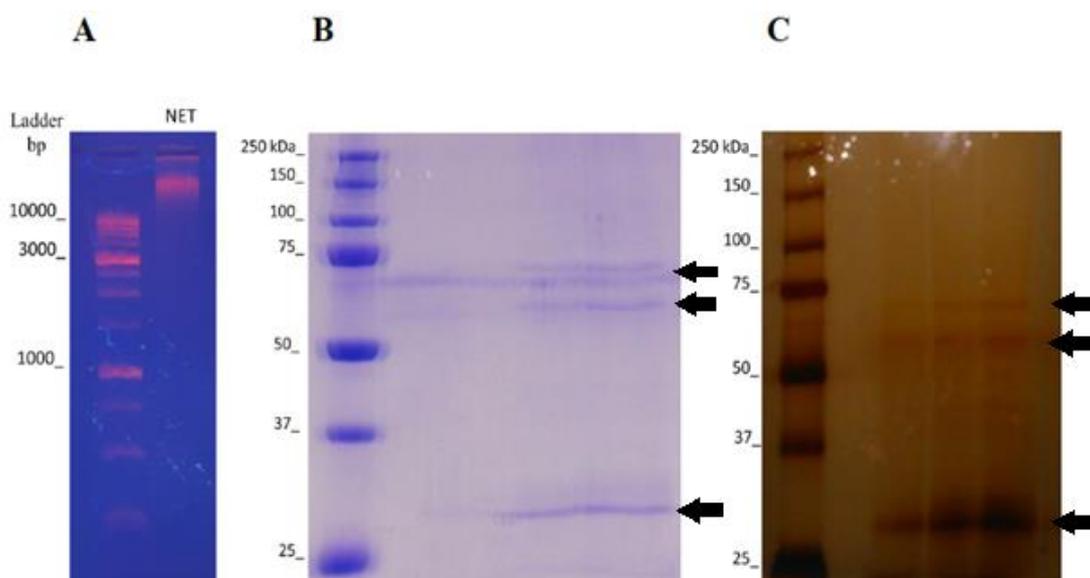


Figura 7. Análise eletroforética dos componentes das NETs. O tamanho e a homogeneidade do DNA nas NETs (134µg/mL) foram avaliados em gel de agarose 1.5% (A). As amostras foram coradas com GelRed e as imagens capturadas em transluminador ultravioleta. A composição proteica das NETs (setas pretas) foi avaliada em gel de poliacrilamida 12% após coloração com Azul de Coomassie (B) e Nitrato de Prata (C). As imagens são representativas de 3 experimentos.

A visualização de proteínas com peso molecular abaixo de 25 kDa foi prejudicada pela densidade de 12% de acrilamida, então soluções de NETs foram submetidas à outra análise, utilizando gel de poliacrilamida de maior densidade, 20% (Figura 8). A coloração do gel 20% evidenciou a presença de proteínas com peso molecular próximo de 15 kDa, o que sugere que essas proteínas sejam histonas (11-15 kDa), classicamente presentes nas NETs e em grande quantidade.

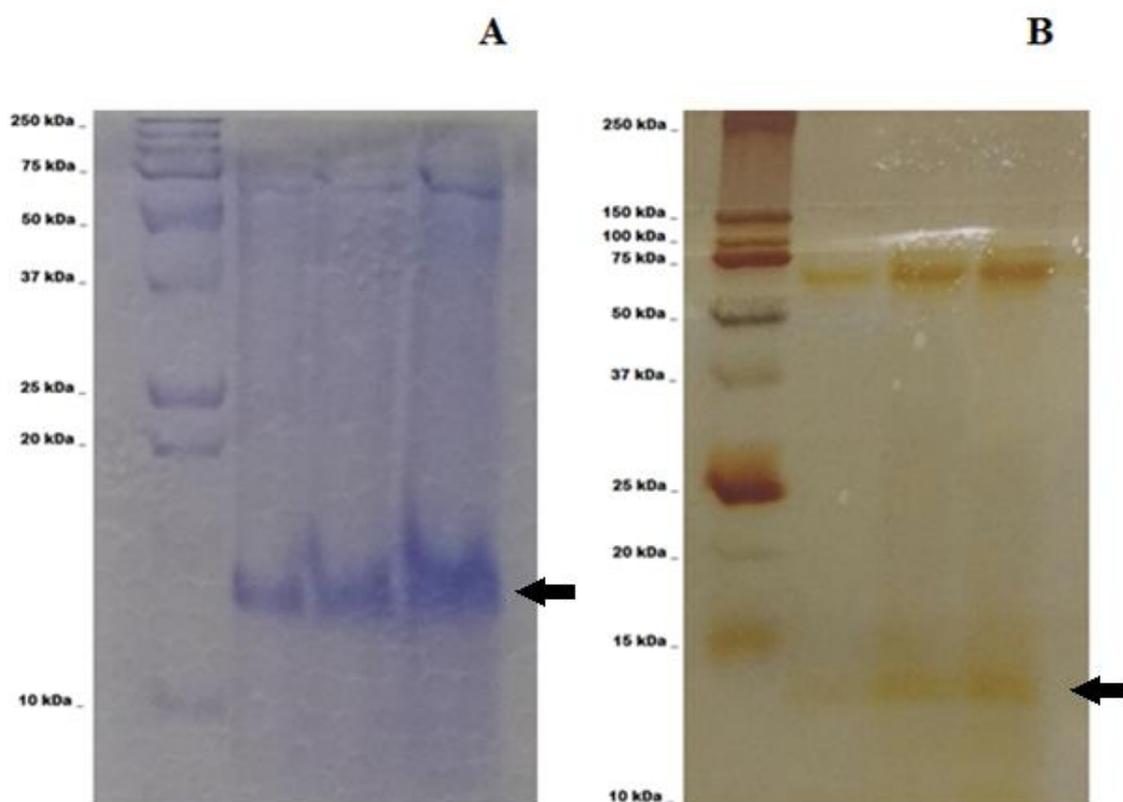


Figura 8. Análise eletroforética dos componentes das NETs. A composição proteica das NETs foi avaliada em gel de poliacrilamida 20% após coloração com Azul de Coomassie (A) e Nitrato de Prata (B). As imagens são representativas de 3 experimentos. Proteínas com peso molecular próximo de histonas destacadas (seta preta).

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que as estruturas liberadas pelos neutrófilos apresentam morfologia e componentes já descritos como constituintes das NETs, ou seja, redes extracelulares de DNA, e outros sugestivos de proteínas granulares. A presença de DNA com alto peso molecular, homogêneo e íntegro, sugere a ocorrência de NETose suicida, onde há liberação de DNA nuclear.

Outras proteínas, presentes em menor concentração, podem não ter sido detectadas em virtude da limitação metodológica, no entanto, o peso molecular das bandas proteicas evidenciadas no perfil eletroforético sugerem a presença de elastase, histonas e mieloperoxidase, proteínas essenciais para a formação das NETs e componentes fundamentais de sua estrutura (Papayannopoulos et al., 2010).

Durante o procedimento de geração das NETs, estas estruturas ao serem coletadas, após 3h de estímulo dos neutrófilos, formam um enovelado que pode ser

visualizado a olho nú com uma aparência densa que não se desfaz facilmente. Este evento impede a total dissolução de moléculas e dificulta sua quantificação e análises necessárias nestes estudo. Esta questão foi resolvida, mantendo-se as NETs por 24hs em banho-maria à 40 °C. Para averiguar se essa etapa poderia afetar a atividade biológica das moléculas constituintes presentes nas NETs, devido a um possível processo de desnaturação, a atividade enzimática de elastase e de mieloperoxidase foi avaliada em diferentes amostras (Figuras 9 e 10).

Quantidades equivalentes de NETs submetidas ou não à 40 °C (NETs 40 °C e NETs fresca, respectivamente) foram incubadas com substrato de elastase. O resultado obtido e convertido em porcentagem (NETs fresca considerada como 100% de atividade), demonstra que na média o aquecimento das NETs por 24hs à 40 °C resulta numa perda de 40% da atividade enzimática da elastase. No entanto, a análise estatística não apontou diferença significativa entre as amostras.

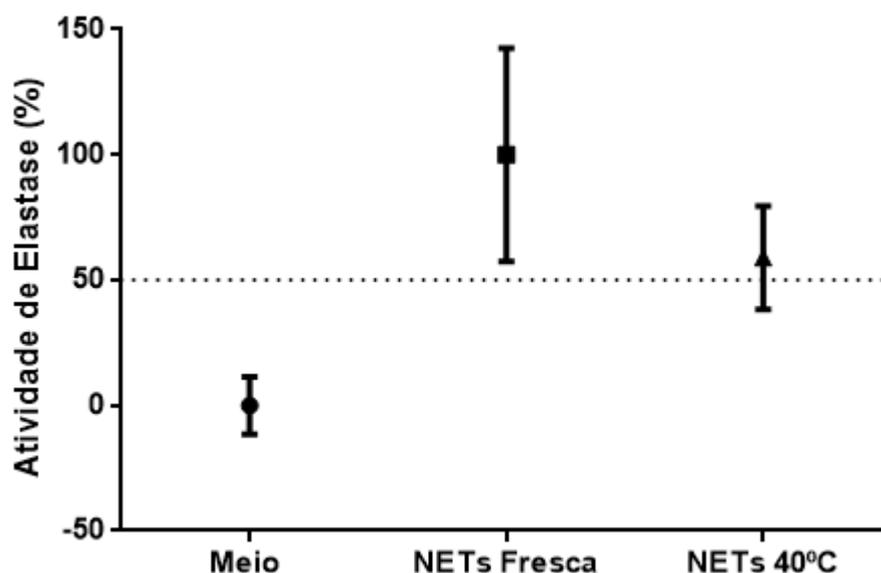


Figura 9. Avaliação da Atividade de Elastase. NETs que passaram por etapa de banho-maria à 40°C e NETs frescas (sem aquecimento) foram incubadas com substrato de elastase (1mM) por 30 minutos. A leitura da absorbância gerada foi realizada em aparelho de espectofotometria à 405nm. Meio de cultura (DMEM F12) foi usado como controle negativo e NETs fresca foi assumida como controle positivo (100% de atividade). O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Os resultados são as médias dos valores obtidos  $\pm$  desvio padrão.

Para medir a atividade enzimática da mieloperoxidase, também foram adicionadas ao ensaio amostras de NETs que foram submetidas por 24 horas à 37

°C (temperatura fisiológica humana). Quantidades equivalentes de NETs submetidas à 37 °C, 40 °C ou NETs fresca (sem aquecimento) foram então incubadas com substrato de mieloperoxidase. O resultado obtido e convertido em porcentagem (NETs fresca considerada como 100% de atividade), demonstra que na média o aquecimento das NETs por 24hs à 37 °C e à 40 °C resulta numa perda de 43,76% e 45,36% da atividade, respectivamente, em relação à NETs fresca.

Os valores obtidos para as NETs à 37 °C e à 40 °C foram muito próximos, mostrando que não há diferença significativa na atividade enzimática da mieloperoxidase nessas duas temperaturas. Apesar de haver uma alta queda de atividade entre NETs fresca e aquecidas, a atividade enzimática das NETs à 37 °C corresponde melhor à realidade encontrada *in vivo* por se tratar da temperatura corporal humana. Banerjee et al. demonstraram em 2011 que a mieloperoxidase é uma enzima extremamente estável, com resistência de aproximadamente 80 °C contra desestabilização estrutural, sendo esta resistência muito importante no seu papel fisiológico na morte de patógenos. A enzima elastase, apesar de ser um pouco menos resistente, começa a sofrer desnaturação apenas a partir de 59 °C (Byler, Lee e Randall, 1999). Portanto, estes dados junto com a literatura, nos sugere que este aquecimento à 40 °C não é prejudicial para o efeito das NETs e para a execução das análises pretendidas.

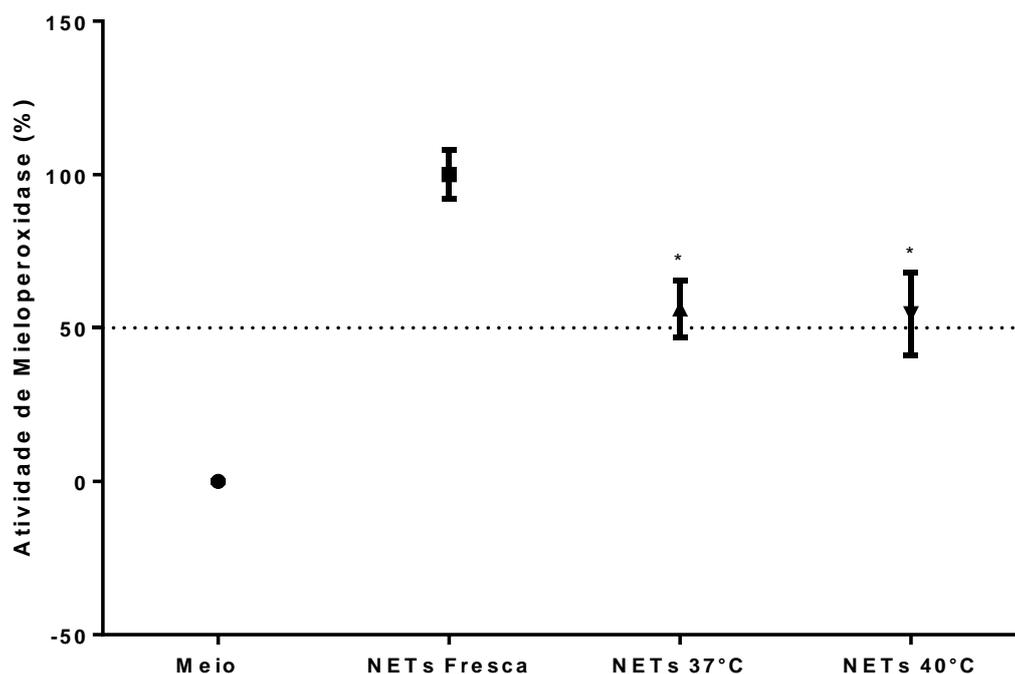


Figura 10. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase. NETs que passaram por etapa de banho-maria à 37°C, 40°C e NETs fresca (sem aquecimento) foram incubadas com substrato de mieloperoxidase (100 µL/poço) por 1 hora. A leitura da absorbância gerada foi realizada em aparelho de espectrofotometria à 405nm. Meio de cultura (DMEM F12) foi usado como controle negativo e NETs fresca foi assumida como controle positivo (100% de atividade). O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados são as médias dos valores obtidos ± desvio padrão. \*p<0.05 quando comparado com o controle positivo (NETs fresca).

Compostos antivirais são caracterizados por apresentar um Índice de Seletividade (IS)  $\geq 4$  (Sidwell, 1986; Lyu, Him e Park, 2005). Este índice indica o quão promissora é a ação antiviral de uma molécula ou composto, sendo calculado com base na determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC50) e a concentração eficiente do composto que protege 50% das células durante uma infecção (CE50), assim,  $IS = CC50/CE50$ . Para avaliar a atividade anti-hRSV das NETs, determinamos inicialmente o valor de CC50 através da análise do efeito citotóxico dessas estruturas em células HEP-2.

Saffarzadeh et al., 2012, demonstraram aumento da citotoxicidade celular de NETs (3.4 – 10.1 µg/ml) em células epiteliais de maneira dose-dependente. No nosso estudo, células HEP-2, permissivas à infecção e replicação do vírus hRSV, foram incubadas com diferentes concentrações de NETs (0.06 - 67µg/ml). A quantidade de  $5 \times 10^4$  células por poço foi determinada por apresentarem confluência

em 24 horas, sem a formação de sobrecamadas. A viabilidade destas células foi avaliada após 4 dias de cultivo em meio DMEM-F12 livre de SFB (Figura 11). As NETs causaram morte celular estatisticamente significativa em concentrações  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ , ocasionando até 32% de morte celular em comparação ao controle. Nenhuma das concentrações testadas resultou em morte de 50% das células, nem mesmo a maior concentração utilizada ( $67\mu\text{g/ml}$ ).

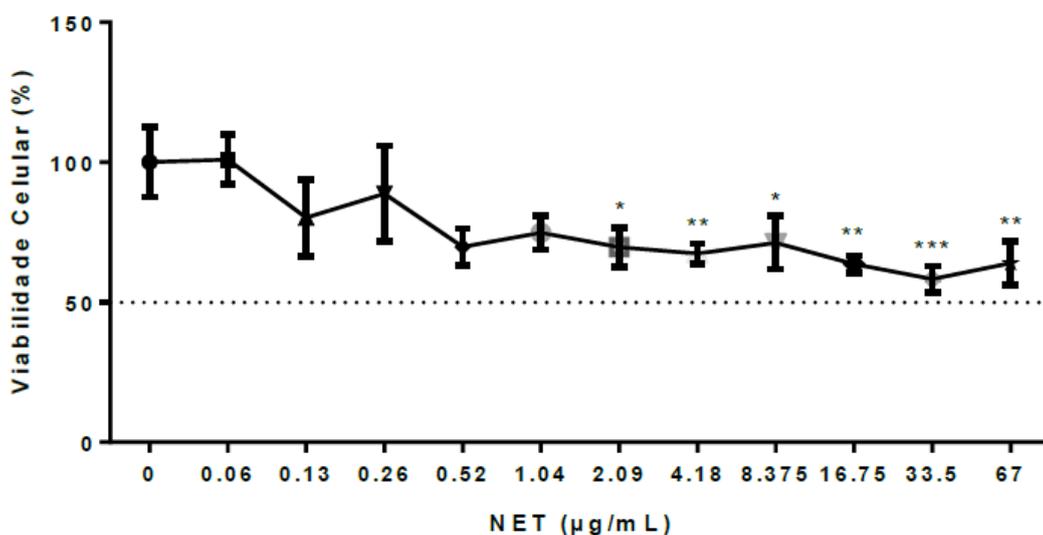


Figura 11. Determinação da CC50 das NETs em células Hep-2. Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ ) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de NETs (0- $67\mu\text{g/mL}$ ) durante 4 dias à  $37^\circ\text{C}$ . A viabilidade das células foi avaliada através do ensaio de MTT. A absorbância obtida em 560nm foi convertida em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular (NET 0  $\mu\text{g/mL}$ ) como 100% de viabilidade. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. A curva é o resultado da média dos valores obtidos  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e avaliados por análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p \leq 0.05$  quando comparado com o grupo controle (NETs 0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Face aos resultados obtidos, determinamos uma elevada  $\text{CC}_{50} > 67\mu\text{g/ml}$ . Outros autores avaliaram a citotoxicidade das NETs em células alveolares endoteliais e epiteliais. Saffarzadeh et. al., 2012 demonstraram efeito citotóxico, de 60%, das NETs ( $\geq 3\mu\text{g/ml}$ ) dependente de histonas e mieloperoxidase, desde que anticorpos anti-histonas e inibidores de mieloperoxidase reduziram os efeitos deletérios das NETs. Inibidores de elastase não apresentaram os mesmos efeitos

inibitórios da citotoxicidade. Os autores discutem que a citotoxicidade apresentada pelas NETs frente as células alveolares pode envolver destruição do tecido pulmonar e agravar determinadas patologias, Em indivíduos acometidos com enfisema pulmonar, a elastase, um dos componentes das NETs, encontra-se aumentada, levando à destruição do parênquima pulmonar e estudos demonstraram que esta doença é capaz de ser induzida experimentalmente pela inalação de elastase (Longhini-dos-Santos et al., 2013; Ribeiro-Paes et al., 2009).

Compostos antivirais podem apresentar efeito inibitório sobre a infecção em virtude de efeitos diretos ou indiretos sobre células e/ou partícula viral. O efeito das NETs no curso da infecção *in vitro* por hRSV foi avaliado em ensaio virucida. Para tanto, nos ensaios virucidas, previamente à infecção, diferentes MOI's (0.1, 0.5 e 1) foram incubados por 1 hora à 4 °C com diferentes concentrações de NETs (0.5-64µg/ml). As concentrações testadas para as NETs foram concentrações sempre abaixo daquela determinada como CC50 (67µg/ml).

Após 3-4 dias de cultivo, a viabilidade celular foi determinada pela adição do sal de MTT e o número de sincícios foi contabilizado por contagem em microscopia de luz (Figura 12). Também foi analisada microscopicamente, após 3 dias de cultivo, a morfologia das células e a formação ou não de sincícios em todos os tratamentos (Figuras 13, 14 e 15). A queda da viabilidade celular causada pelo efeito citopático do vírus em células não tratadas foi considerado como 0% de proteção celular. Por outro lado, células não infectadas e sem tratamento com NETs foram consideradas como 100% de proteção celular.

No ensaio virucida realizado com inóculo viral MOI 0.1, as NETs apresentaram proteção celular superior a 50% em baixas concentrações (CE<sub>50</sub>~1µg/ml) e proteção mais efetiva e significativa estatisticamente em concentrações maiores (2-8µg/ml). A proteção celular diminuiu com valores elevados de NET, levando a um maior dano celular e queda da viabilidade (Figura 12A). Observamos ainda, que nestas concentrações (2-8µg/ml), houve redução de mais de 50% na formação de sincícios (Figura 12B). Esperava-se que concentrações maiores apresentassem melhores índices de proteção celular. Concentrações aumentadas de NETs (≥16ug/ml) reduziram fortemente o número de sincícios

(Figura 12B), ao passo que o dano celular também foi agravado, havendo grande queda da viabilidade (Figura 12A).

Na análise morfológica das células (Figura 13), células não infectadas (controle celular) apresentaram tapete celular confluyente, com ausência de células mortas e de sincícios. Células infectadas (controle viral) apresentaram morfologia alongada, redução no número de células e presença elevada de sincícios. Baixas concentrações de NETs (0.5 e 1µg/ml) apresentaram uma alta contagem de sincícios, mas de tamanho reduzido, sendo dificilmente visualizados nas imagens apresentadas. Na presença de concentrações de NETs que foram efetivas na proteção celular (<8µg/ml), observa-se grande diminuição do número de sincícios em relação ao controle viral, mesmo os sincícios nestas condições apresentando, um tamanho reduzido e não houve grande diminuição no número de células. Nas concentrações mais elevadas de NETs (≥16µg/ml), apesar de haver uma grande diminuição na contagem do número de sincícios, observa-se acentuada redução no número de células e presença de células não aderidas. A formação de sincícios teve sua quantidade reduzida, mas estes apresentaram grande tamanho.

A análise destes dados, juntamente com aqueles apresentados na Figura 11 e pela literatura (Saffarzadeh et. al., 2012; Funchal et al., 2015), nos levam a sugerir que a presença simultânea do vírus e das NETs na cultura celular, agem de maneira sinérgica com relação ao efeito citotóxico individual de cada um. Esta hipótese explicaria, ao menos parcialmente, a redução no número de sincícios como consequência do seu tamanho e da redução do número de células em concentrações elevadas de NETs.

Nos ensaios seguintes, o inóculo viral (MOI) foi aumentado com o intuito de aprofundarmos o efeito protetor das NETS. Assim, verificamos resultados semelhantes àqueles obtidos com MOI 0.1 ao testarmos um inóculo 5x maior (MOI 0.5) (Figuras 12C-D). NETs (1-8µg/ml) mantiveram um mínimo de 50% de proteção celular, incluindo redução no número de sincícios e apresentaram  $CE_{50} = 1,02$ . Concentrações ≥16 µg/ml não foram consideradas efetivas, uma vez que reduziram o número de sincícios em detrimento da redução do número de células viáveis e do tamanho dos sincícios formados (Figura 14).

O aumento do inóculo viral para MOI 1 (10 vezes maior) resultou em redução acentuada dos efeitos anti-hRSV das NETs. Nenhuma das concentrações de NETs testadas foi capaz de evitar ou reverter os danos celulares causados pela infecção viral, não apresentando nenhuma proteção estatisticamente significativa (Figura 12E). A falta de proteção celular em MOI 1 pode indicar um efeito virucida limitado das NETs em situações em que a carga viral se encontra elevada. Apesar de não ter sido observada proteção celular de acordo com o ensaio de viabilidade, a contagem de sincícios nesta condição apresentou valores significativos na diminuição dos focos virais, sendo que as concentrações de 2 e 4µg/ml foram as mais efetivas nessa redução (Figura 12F). Nestas concentrações podemos observar um leve aumento da viabilidade celular, mas que não foi o suficiente para gerar proteção significativa. Na análise morfológica das células (Figura 15), observa-se que em todas as concentrações houve redução no número de células e presença de células alongadas, além de uma alta quantidade de sincícios, sendo que nas concentrações elevadas de NETs os sincícios apresentaram tamanho extenso.

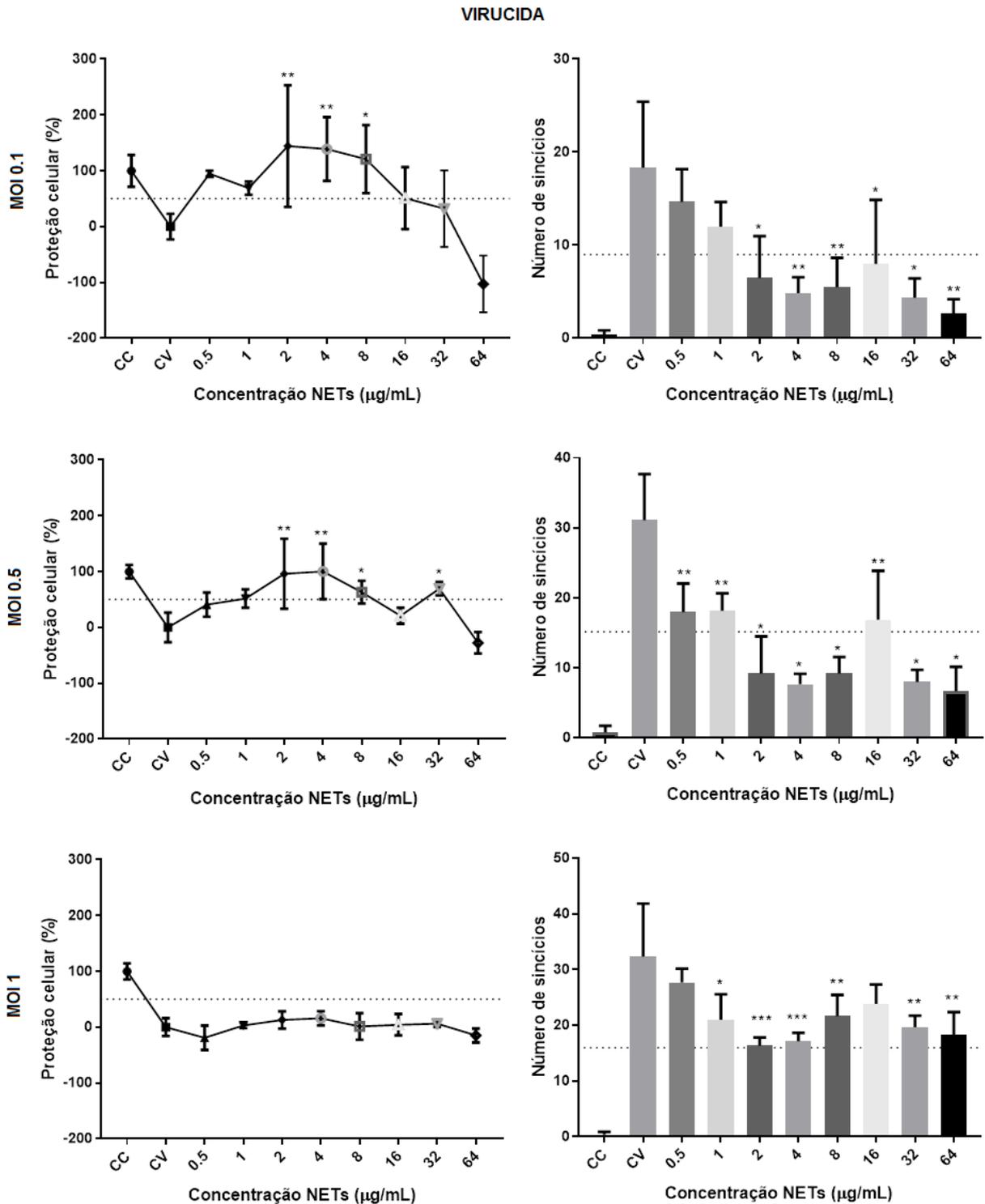


Figura 12. Efeito virucida das NETs sobre o hRSV pela avaliação da % de proteção celular (A, C, E) e da formação do número de focos virais (B, D, F). O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. A curva é o resultado da média dos valores obtidos  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism 6 e avaliados por análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p \leq 0.05$  quando comparado com o controle viral.

Virucida  
MOI 0.1

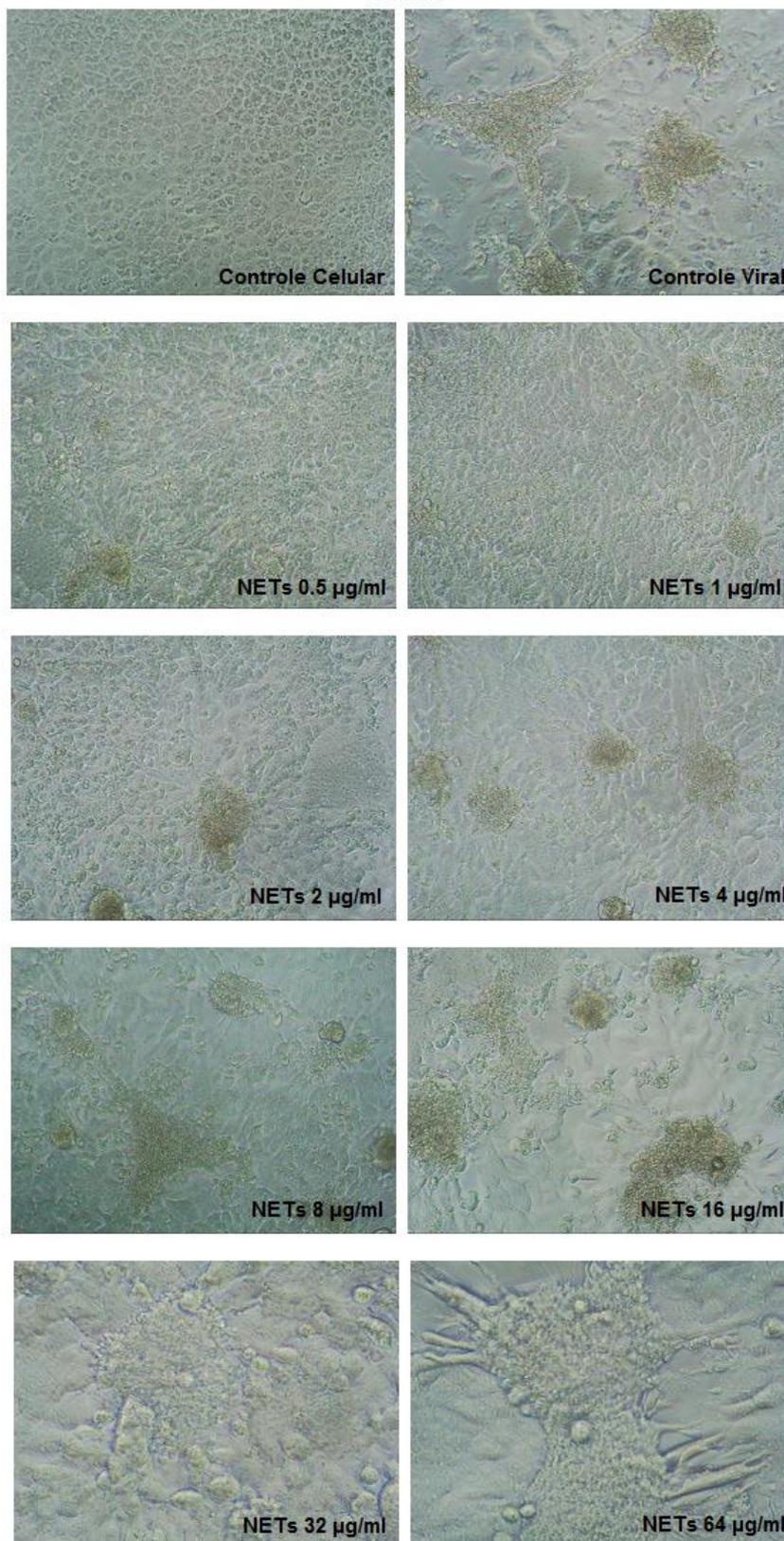


Figura 13. Morfologia de células HEP-2 infectadas por hRSV (MOI 0.1) com diferentes tratamentos de NETs (0.5-64 µg/ml), avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40X.

Virucida  
MOI 0.5

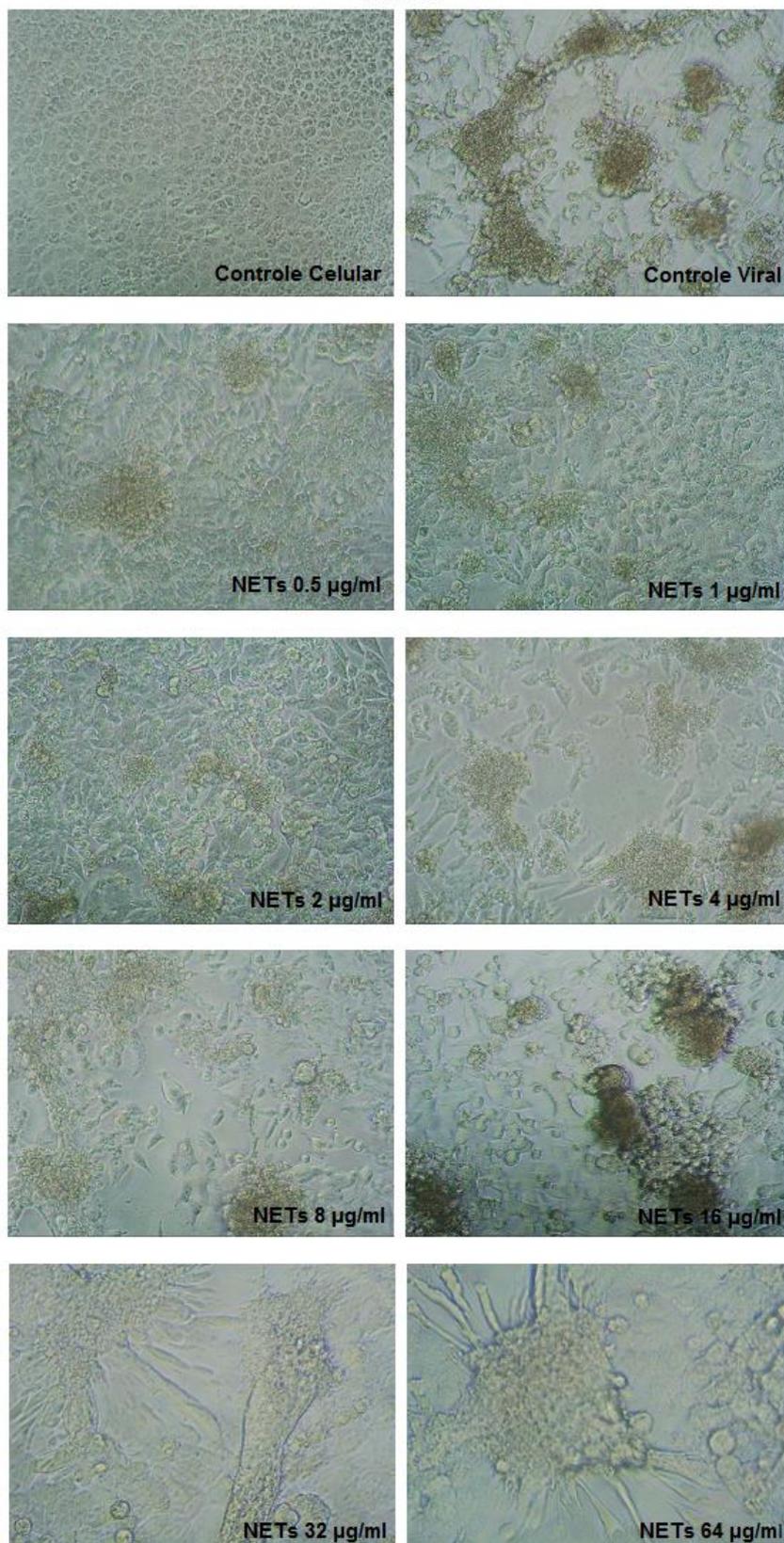


Figura 14. Morfologia de células HEP-2 infectadas por hRSV (MOI 0.1) com diferentes tratamentos de NETs (0.5-64 µg/ml), avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40X.

Virucida  
MOI 1

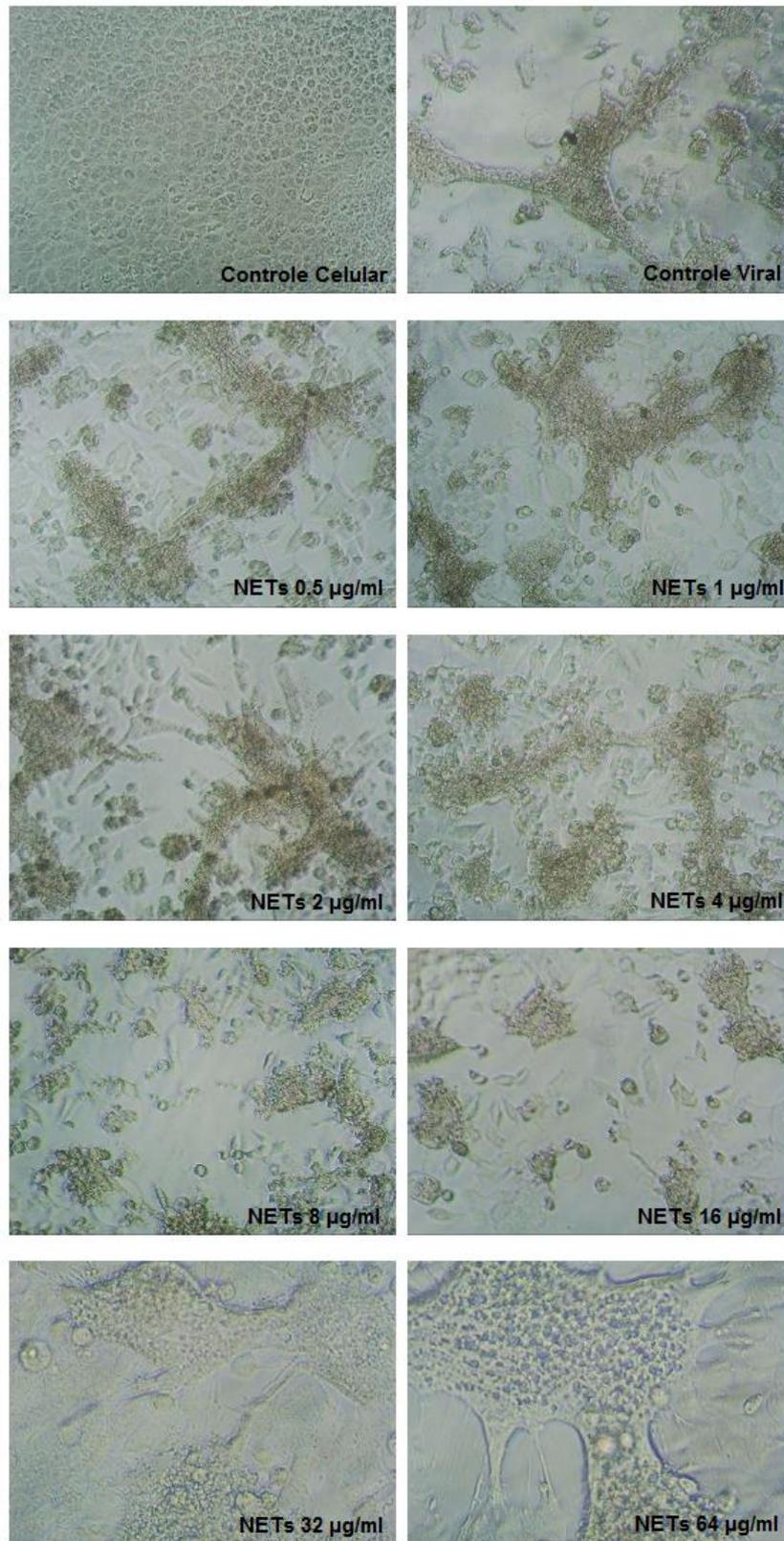


Figura 15. Morfologia de células HEP-2 infectadas por hRSV (MOI 0.1) com diferentes tratamentos de NETs (0.5-64 µg/ml), avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40X.

O conjunto de dados obtidos com os ensaios virucidas indicam ação anti-hRSV das NETs com efeito direto sobre as partículas virais, sugerindo que haja interação física entre o vírus e a estrutura de DNA/proteínas. O efeito observado na redução de sincícios nas concentrações de 2-4 µg/ml, sem aumento da morte celular, pode indicar alguma interferência das NETs na fusão celular proporcionada pela proteína viral F, mas sem inibir a replicação viral, uma vez que a fusão celular proporcionada pela proteína F se apresenta como um dos mecanismos efetivos na dispersão do vírus ao longo do tecido celular (Pastey, Crowe e Graham, 1999).

Juntos, nossos resultados demonstram que, em determinadas concentrações, as NETs podem minimizar a infecção pelo hRSV por apresentar efeitos inibitórios sobre a partícula viral (virucida) levando à diminuição da formação de sincícios e da morte celular. Além disso, o fato de utilizarmos NETs aquecida à 40 °C (24hs), parece não interferir na presença de atividade anti-hRSV, sendo a atividade semelhante àquela observada em temperatura fisiológica humana (37 °C). Os valores de CE50 e IS referentes ao efeito anti-hRSV das NETs podem ser visualizados na **Tabela 1**. O efeito virucida das NETs se mostrou fortemente dependente da carga viral. Cortjens et al. (2015) demonstraram que partículas virais de hRSV (MOI 0.03-0.4), na presença de neutrófilos ativados, são capturadas pelas NETs prevenindo assim a infecção viral de células. Os autores não discutem sobre a presença de mediadores inflamatórios e antivirais secretados pelos neutrófilos em estado de ativação, ou mesmo fagocitose clássica que poderiam auxiliar na redução da infectividade do vírus ou do número de partículas virais.

Tabela 1. Valores de CE50 e IS das NETs no protocolo virucida

	Virucida		
	MOI .01	MOI 0.5	MOI 1
CE50	~ 1µg/ml	1.02µg/ml	-
IS*	~ 67	65.7	-

\*IS=CE<sub>50</sub>/CC<sub>50</sub> IS ≥ 4 promissor

Os benefícios observados quanto à presença das NETs com relação ao vírus hRSV devem ser analisados com cuidado já que uma intensa resposta neutrofílica pode contribuir para a patologia desta infecção viral. Durante nossas análises, a

presença das NETs (> 16µg/ml), mesmo que em concentrações menores que a CC50 (67µg/ml), resultou em maior dano celular quando da presença do vírus. Sabe-se que o dano tecidual e a disfunção do órgão pela ativação prolongada e exagerada dos neutrófilos resulta em complicações clínicas de um grande número de doenças incluindo as pulmonares e aquelas relacionadas ao hRSV (Cortjens et al., 2015). A presença das NETs no tecido pulmonar de indivíduos infectados pelo hRSV tem sido apontada como um dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na obstrução e dano tecidual das vias aéreas. Estes mecanismos contribuem para a diminuição da capacidade de ventilação do indivíduo, reação ao tratamento e qualidade de vida (Cortjens et al., 2015; Funchal et al., 2015).

Concluimos assim que as NETs possuem efeito anti-hRSV por agir diretamente sobre a partícula viral (efeito virucida). Nessa situação nossos dados sugerem que a ação anti-hRSV das NETs possa estar relacionada com a sua interação junto a proteínas virais importantes na infecção/replicação/disseminação do hRSV. Além disso, a redução na formação de sincícios, observada na presença das NETs, pode indicar uma relação entre estas moléculas e a proteína F viral, responsável pela fusão celular característica durante a infecção pelo hRSV.

Para auxiliar na compreensão de mecanismos e processos celulares é necessário entender o modo de interação entre macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos) ou entre macromoléculas e ligantes. O conhecimento da identidade das proteínas, bem como o modo de interação delas com uma proteína-alvo possui importante papel no entendimento de processos fisiopatológicos, e ainda contribuem para o planejamento de novos fármacos e tratamentos (Verli, 2014).

Ferramentas de bioinformática tem se tornado cada vez mais importantes no estudo de processos biológicos e interdisciplinares (biologia, biotecnologia e computação) através da geração, armazenamento e interpretação de dados (Verli, 2014). O *docking molecular* tem sido uma das técnicas mais utilizadas para estudos *in silico*, permitindo a predição e análise da interação entre moléculas complexadas (Huang, 2015). O *docking*, ou atracamento molecular, consiste na predição da orientação preferencial de uma molécula em relação à outra, quando estas formam um complexo. A conformação e o modo de interação entre as moléculas são baseados na complementariedade de tamanho, forma, distribuição de cargas,

polaridade, potencial da interação e afinidade entre as estruturas, gerando pontuações (*scores*) e valores de energia que indicam os melhores modelos gerados (Polanski e Kimmel, 2007).

Neste trabalho, o *docking molecular* foi utilizado na complementariedade da investigação e interpretação dos dados experimentais *in vitro*. Para tanto, foi avaliada a interação entre algumas proteínas que compõem as NETs (elastase e histonas) com a proteína F do hRSV, pré e pós-fusão, pois ambas as conformações se encontram presentes na superfície da partícula viral (Liljeroos et al., 2013; Killikelly, Kanekiyo e Graham, 2016).

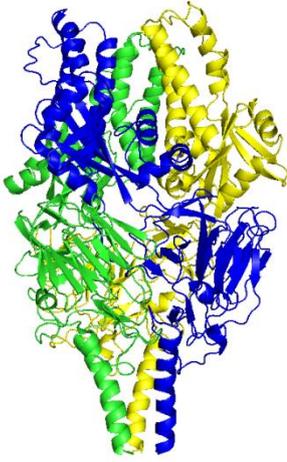
A proteína F do hRSV é descrita como fundamental para a infecção viral (McLellan et al., 2014; Graham, 2016; Chen et al., 2016), e recentemente foi descrita pela sua capacidade em estimular a liberação das NETs (Funchal et al., 2015). Esta proteína é altamente conservada entre os grupos antigênicos do vírus, permitindo que uma possível ação antiviral dirigida contra esta proteína seja mais abrangente e eficaz num futuro tratamento.

Dentre as proteínas componentes das NETs, algumas se destacam por sua presença em grande quantidade e/ou ação microbicida. A molécula de DNA apresenta alto poder de captura de patógenos em virtude do seu tamanho e características físico-químicas. Tal efeito é aumentado e melhorado pela presença de várias proteínas como elastase e histonas. As histonas são as proteínas em maior abundância presentes nas NETs e juntamente com a elastase regulam a formação das NETs, exercendo posteriormente papel microbicida (Brinkmann et al., 2004; Borregaard, 2010; Hirsch, 1958; Papayannopoulos et al., 2010).

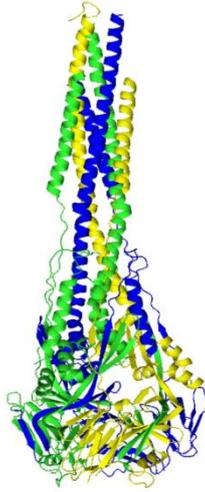
O banco de dados Protein Data Bank foi utilizado na busca por estruturas de cristalografia referentes à proteína de fusão F do hRSV. Foram encontradas mais de 20, todas complexadas com algum anticorpo ou inibidores em sítios de ligação. As estruturas PDB ID 4JHW (pré-fusão) e PDB 3RRR (pós-fusão), embora não completas, apresentaram maior número de aminoácidos e menor número de alterações em sua estrutura. A região ausente compreende a região transmembrânica viral (aminoácidos 530 – 550) e a região citoplasmática (551-574). Assumimos que tais regiões, por não estarem disponíveis no meio extracelular e, portanto não disponíveis para interações, não seriam primordiais em nosso estudo.

A proteína F atua em sua forma trimérica e para tanto, o trímero no estado de pré-fusão foi gerado através do servidor Symmdock, a partir da estrutura monomérica obtida no PDB. O servidor gerou 100 estruturas e o modelo escolhido foi aquele que apresentou maior *score*, 13186 (pontuação utilizada para indicar os melhores complexos gerados) e a também a maior área de contato entre os domínios de oligomerização. A topologia do trímero foi compatível com aquela observada na literatura (McLellan et al., 2013) (Figura 16A).

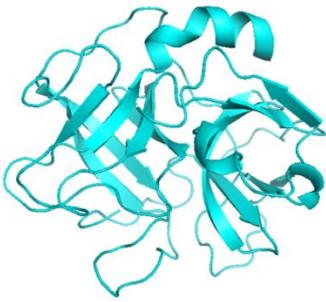
(A)



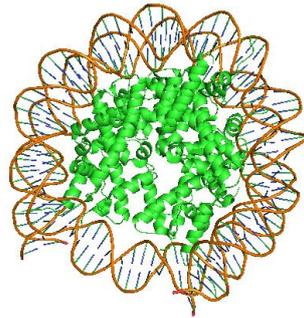
(B)



(C)



(D)



(E)

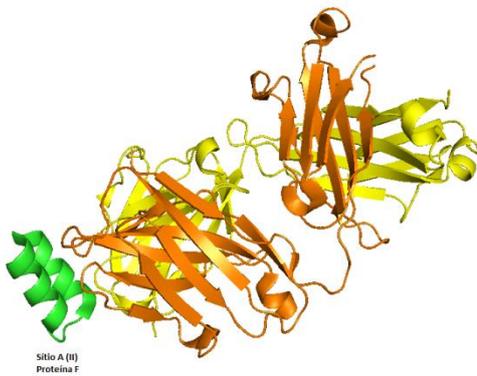
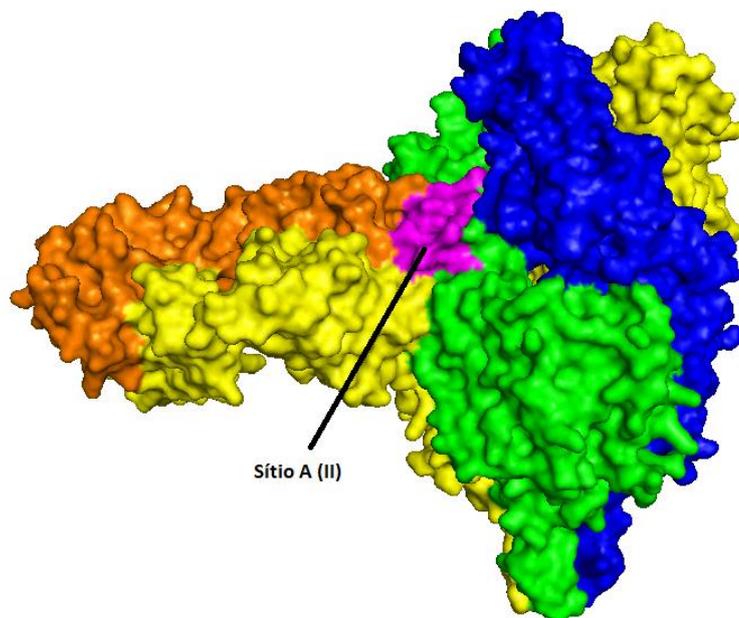


Figura 16. (A) Trímero da proteína F (pré-fusão) gerado pelo servidor Symmdock, (B) trímero da proteína F (pós-fusão), PDB ID 3RRR, (C) elastase neurofilica humana, PDB ID 3Q76, (D) nucleossomo complexado com DNA, PDB ID 3AFA e (E) Motavizumab complexado com a região do sítio A da proteína F, PDB ID 3IXT.

As estruturas escolhidas para Proteína F (pós-fusão) (PDB ID 3RRR), elastase (PDB ID 3Q76) e histona (PDB ID 3AFA) seguiram os mesmos critérios, sendo que estas proteínas possuem estruturas completas no banco de dados (Figuras 16B-D). As histonas foram obtidas na forma de nucleossomo, contendo todas as histonas em complexo com o DNA, assim como ocorre nas NETs (Wang et al., 2009). Além disso, a estrutura do anticorpo Motavizumab (PDB ID 3IXT), de interação já conhecida com a proteína F, foi obtida para servir de comparação com outros complexos gerados (Figura 16E). O anticorpo Motavizumab interage com o sítio A (sítio II) da proteína F que neutraliza a fusão do vírus com a célula (McLellan et al., 2010). A figura 16E mostra a interação desse complexo obtido por cristalografia (PDB ID 3IXT).

A análise teste do *docking molecular*, utilizando o refinamento de dados pelo FireDock após busca de conformação pelo PatchDock, entre o Motavizumab e o trímero da proteína F, resultou em interação do anticorpo no sítio A da proteína F, como descrito na literatura, em ambas as conformações (Figura 17 e 18). Quanto menor a energia de ligação de um complexo, mais estável sua interação. A energia obtida nas interações foi de -11.31 kcal/mol, na conformação pré-fusão, e de -29.4 kcal/mol na conformação pós-fusão. O modelo gerado pelo refinamento dos dados apontou o melhor complexo gerado com um alto *score* (14170), conformação pré-fusão, e *score* (15372), conformação pós-fusão. Uma área extensa de superfície de contato foi obtida entre as duas proteínas, sendo de 2045.70 Å<sup>2</sup> (pré-fusão) e 2052.80 Å<sup>2</sup> (pós-fusão).

(A)



(B)

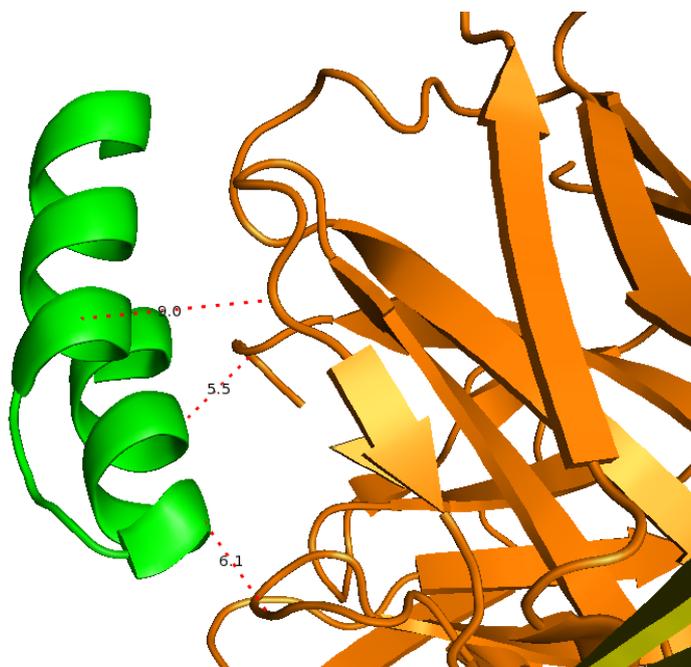
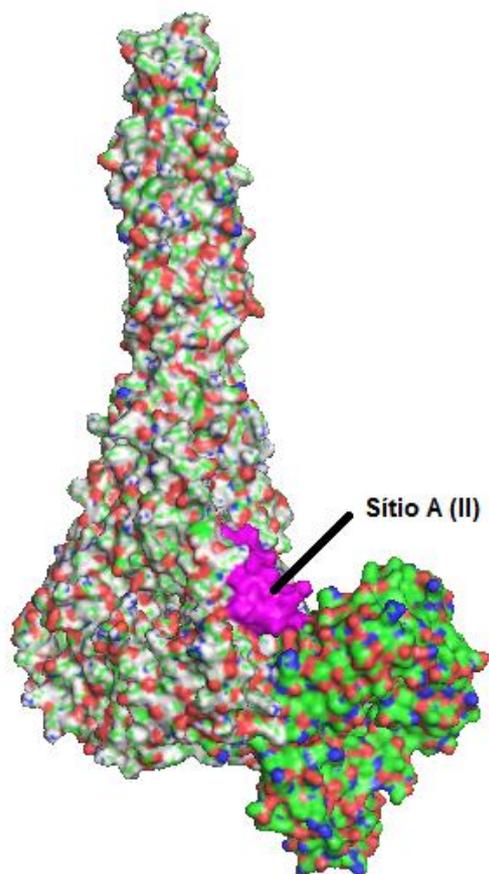


Figura 17. (A) Modelo da interação entre a proteína F (pré-fusão) e Motavizumab, gerado pelo servidor PatchDock. A região de interação (roxo) ocorre no sítio A da proteína F. Modelo de superfície

onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (B) Distâncias (Å) entre as regiões de interação entre a proteína F e Motavizumab, mensuradas pelo visualizador PyMol.

**(A)**



**(B)**

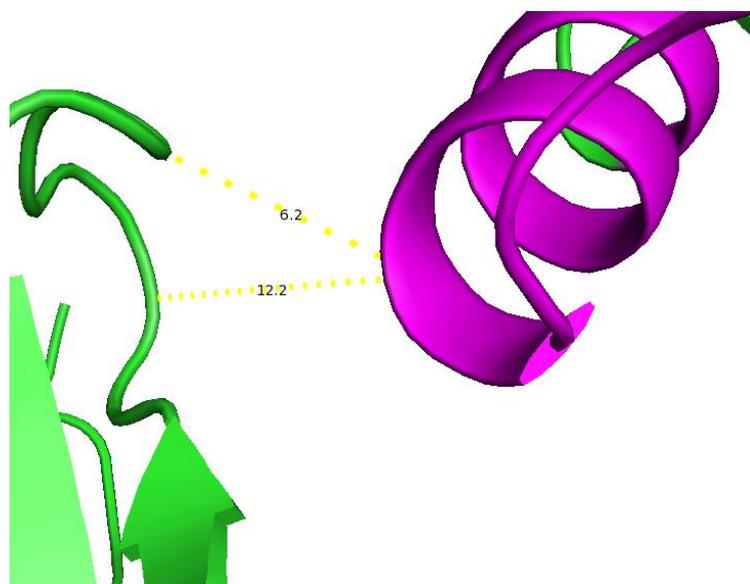


Figura. 18. (A) Modelo da interação entre a proteína F (pós-fusão) e Motavizumab, gerado pelo servidor PatchDock. A região de interação (roxo) ocorre no sítio A da proteína F. Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (B) Distâncias (Å) entre as regiões de interação entre a proteína F e Motavizumab, mensuradas pelo visualizador PyMol.

Proteína F e elastase foram analisadas via busca de conformações pelo PatchDock e com posterior refinamento de dados pelo FireDock, analisando sua energia de ligação. Os melhores modelos dos complexos gerados pelo *docking* daquelas moléculas demonstram que existe uma provável interação entre proteína F, em ambas as conformações, e elastase, com energia de -34.08 kcal/mol, para pré-fusão, e de -36.01 kcal/mol, para pós-fusão. A energia obtida é três vezes maior do que a interação do complexo proteína-Motavizumab, na pré-fusão, e também maior do que a interação proteína-Motavizumab, na pós-fusão, demonstrando alta estabilidade do complexo gerado. Os scores (16330) e (15152), pré e pós-fusão respectivamente, dos modelos gerados também foram superiores, indicando grande probabilidade dos complexos formados serem viáveis. A área de superfície de contato foi de 2051.00Å<sup>2</sup>, pré-fusão, e de 2220.10 Å<sup>2</sup> pós-fusão (Figura 19A-C). Apesar dos complexos em ambas as conformações terem resultados com valores similares, os sítios de interação obtidos foram em diferentes regiões. A região de interação, apontada pelo *docking*, da elastase com a proteína F pré-fusão se localiza muito próxima do sítio A (II) (sítio de interação para o Motavizumab), e do sítio C (IV e V) (sítios de interação com o anticorpo 101F), indicando que o complexo gerado pode resultar em inibição da partícula viral e contribuir na ação antiviral das NETs. A interação da elastase com a proteína F pós-fusão se localiza no sítio I da proteína viral, um sítio de interação conhecido por se ligar ao anticorpo 131-2a, mas que gera uma fraca neutralização da atividade viral e preferencialmente no estado de pós-fusão (Killikelly, Kanekiyo e Graham, 2016).

A neutralização da proteína F pelo sítio A e pelo sítio C, leva à inibição da atividade de fusão do vírus com a célula do hospedeiro, ao passo que a neutralização da proteína F pelo sítio I leva à inativação de fusão célula-célula em células infectadas. Todas as interações, nos sítios A, C e I, foram similarmente próximas e estáveis, de acordo com os valores gerados pelo *docking*. Se a elastase realmente age nesses sítios, ela poderia ser uma das responsáveis pela proteção

celular observada nos ensaios virucida ao inibir a formação de sincícios e a disseminação do vírus. A elastase não é uma das proteínas de maior quantidade nas NETs, apesar de estar dentre aquelas com maior potencial citotóxico (Papayannopoulos et al., 2010; Weinrauch et al., 2002). A presença aumentada de NETs no tecido e conseqüentemente de elastase poderia auxiliar na redução da carga viral e na formação dos sincícios, mas isso também poderia implicar em maior dano celular.

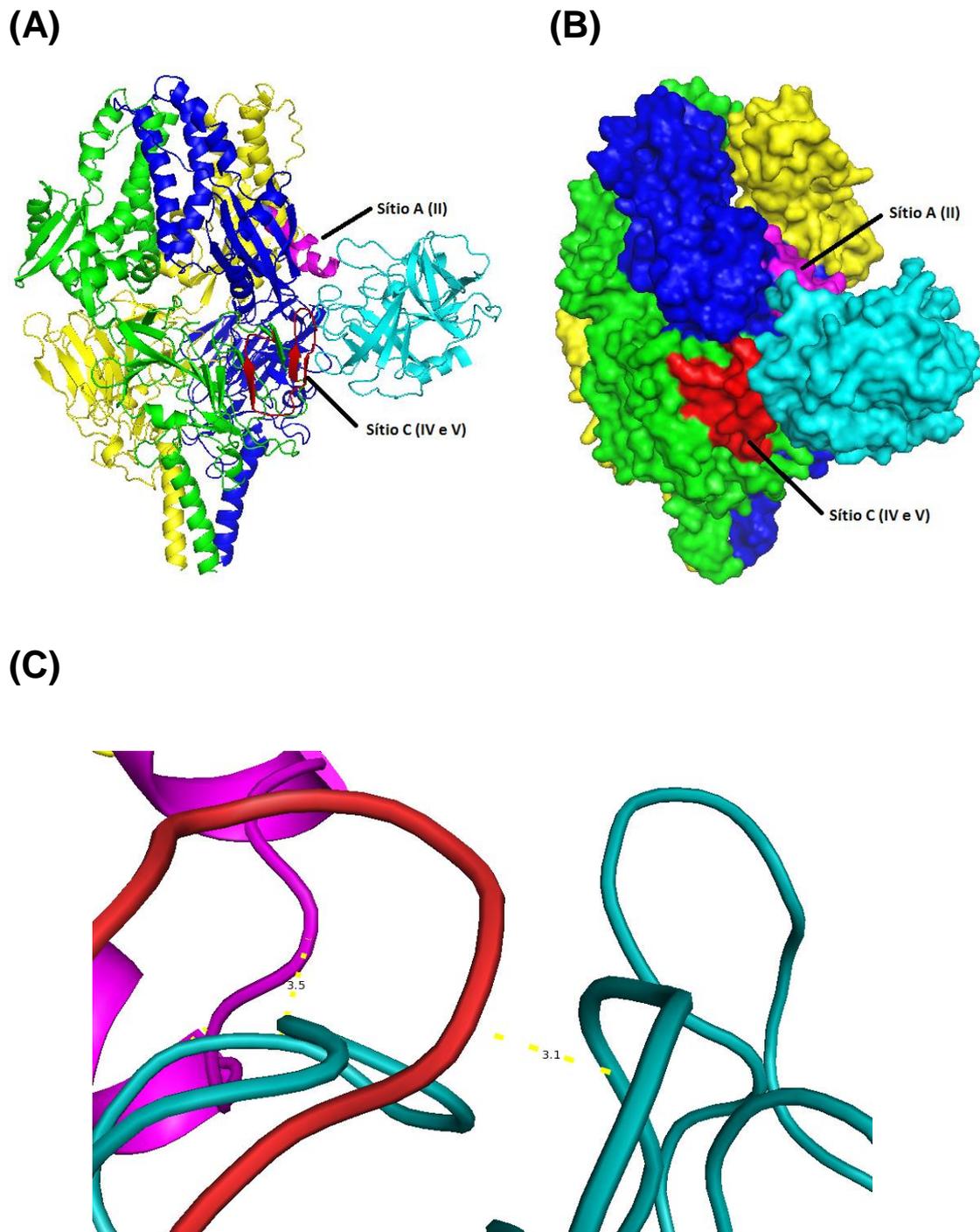
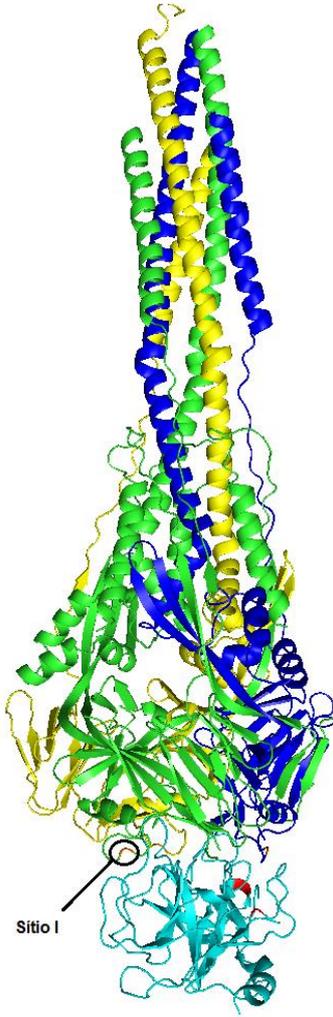
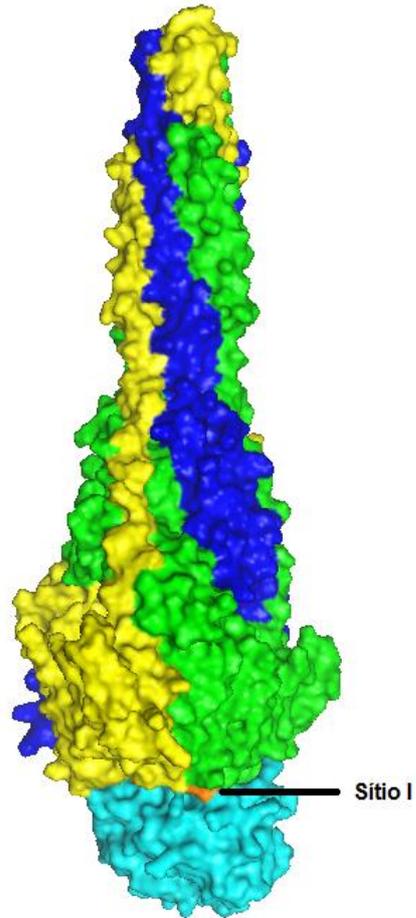


Figura 19. (A) Modelo da interação entre a proteína F pré-fusão e a elastase, gerado pelo servidor PatchDock. As regiões de interação (roxo) (vermelho) ocorrem nos sítios A e C da proteína F, respectivamente. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (C) Distância entre as regiões de interação entre a proteína F e a elastase, gerado pelo servidor PatchDock.

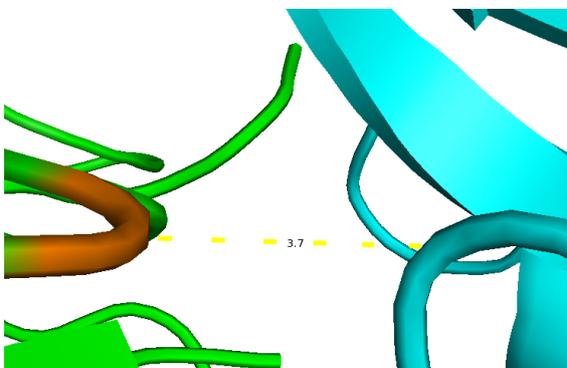
(A)



(B)



(C)



(D)

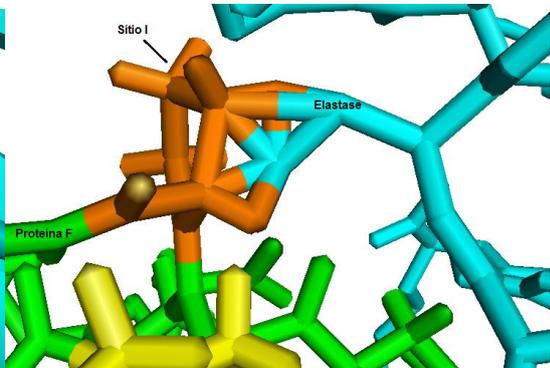


Figura 20. (A) Modelo da interação entre a proteína F pós-fusão e a elastase, gerado pelo servidor PatchDock. A regiões de interação (laranja) ocorre no sítio I da proteína F.. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (C) Distância entre as regiões de interação entre a proteína F e a elastase, gerado pelo servidor PatchDock. (D) Modelo de *sticks* onde é possível ver a interação entre a elastase e o sítio I da proteína F.

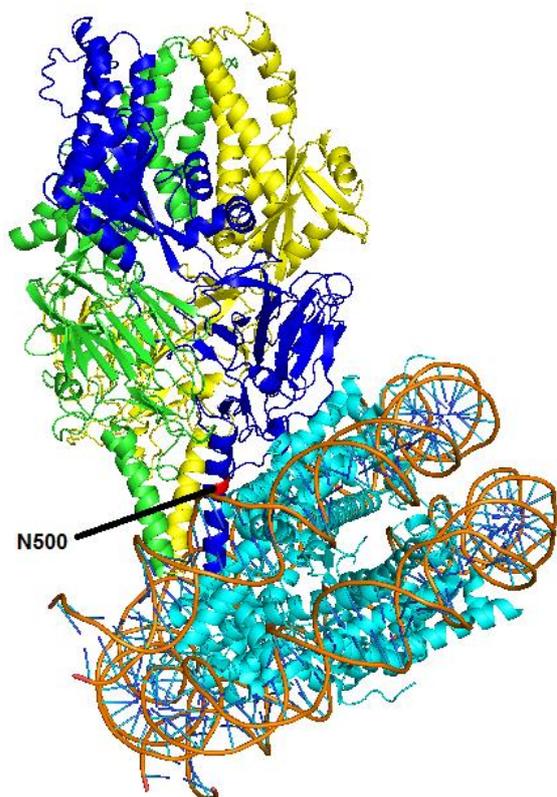
O *docking molecular* entre as histonas e a proteína F pré-fusão também gerou resultados promissores, com uma energia de -27.68 kcal/mol para o melhor modelo do *rank* (score 10116), e uma área de interação de 1226.50 Å, indicando que possa existir uma ótima interação entre estas proteínas (Figura 21A-C). A interação entre histonas e proteína F pós-fusão resultou em uma energia de -17.01 kcal/mol para o melhor modelo do *rank* (score 9426), e uma área de interação de 1715.20 Å. A menor energia observada nesta interação indica uma maior estabilidade do complexo histonas-proteína F na conformação pré-fusão, sugerindo uma melhor ação das histonas sob o vírus nessa situação.

A presença do DNA mais fortemente complexado às histonas do que às outras proteínas das NETs (devido à estrutura do nucleossomo), poderia favorecer a interação das histonas com a proteína F devido à grande concentração de carga negativa do DNA, facilitando a interação e estabilização entre essas estruturas. A região mais próxima de interação do complexo nucleossomo-proteína F pré-fusão ocorreu em uma região de glicosilação (n500) da proteína F, indicada na literatura como a região de glicosilação de maior importância para a ação de fusão do vírus (Zimmer, Trotz, Herrler, 2001). Quando esta região é mutada, a atividade de fusão do vírus, assim como a formação de sincícios cai em aproximadamente 90% (Zimmer, Trotz, Herrler, 2001). A interação do complexo nucleossomo-proteína F pós-fusão ocorreu no sítio C, assim como na interação com elastase.

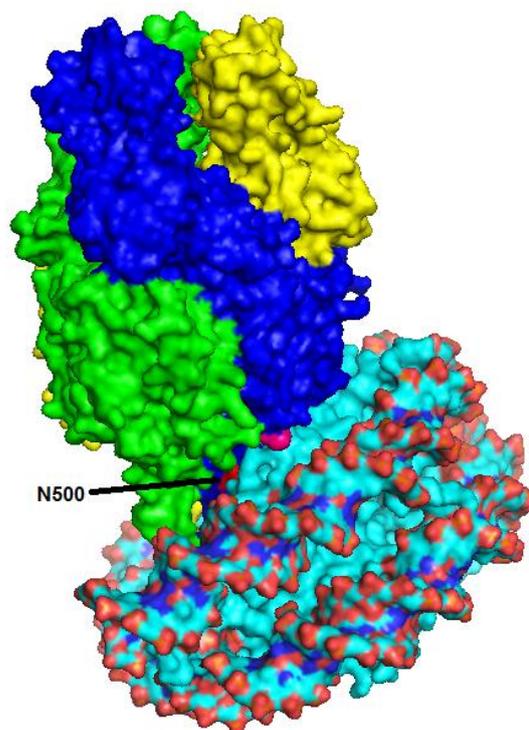
As histonas são as proteínas mais abundantes encontradas nas NETs. Associadas a uma complexa e extensa rede de DNA, as histonas contribuiriam na captura dos vírions e na criação de barreiras físicas que impediriam a interação da proteína F com a membrana plasmática da célula. Portanto, a exemplo do complexo elastase-proteína F, a interação das histonas na região n500 e no sítio C, juntamente com o DNA, poderia resultar em ação antiviral das NETs por interferir em fases iniciais do ciclo viral (adesão/internalização) ou mesmo na formação de

sincícios. Os valores e sítios resultantes das interações entre proteínas das NETs e proteína viral podem ser visualizados na **Tabela 2**.

(A)



(B)



(C)

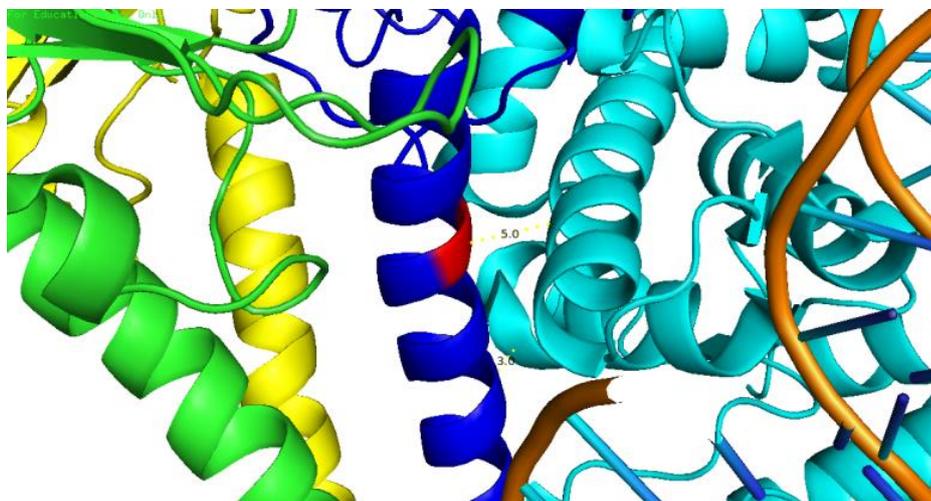
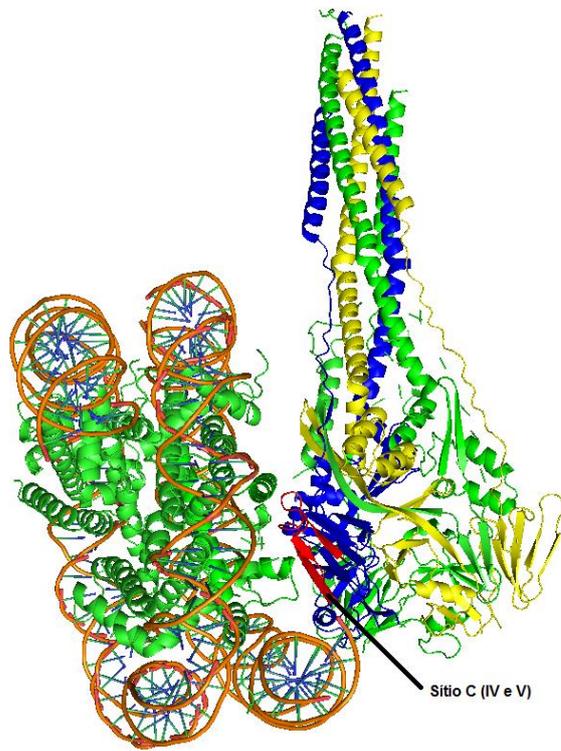
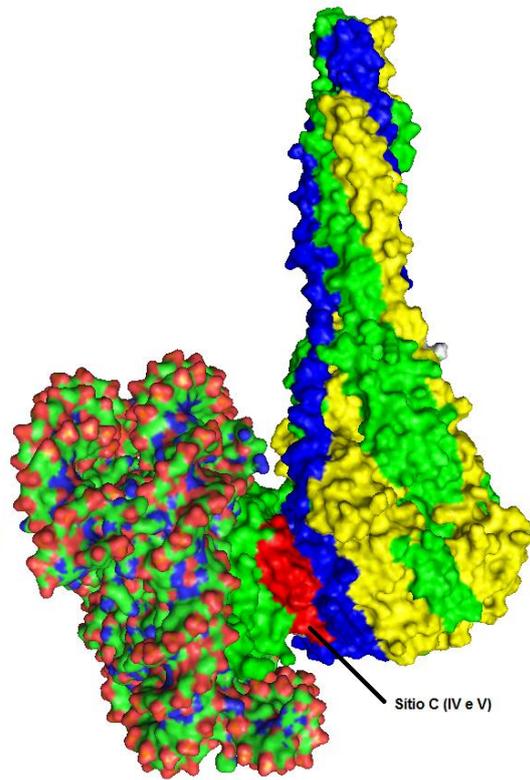


Figura 21. (A) Modelo de interação entre a proteína F pré-fusão e o nucleossomo, gerado pelo servidor PatchDock. A região de interação (vermelho) ocorre na região de glicosilação n500 da proteína F. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas proteínas. (C) Medida da região de interação entre a proteína F e o nucleossomo, gerado pelo servidor PatchDock.

(A)



(B)



(C)

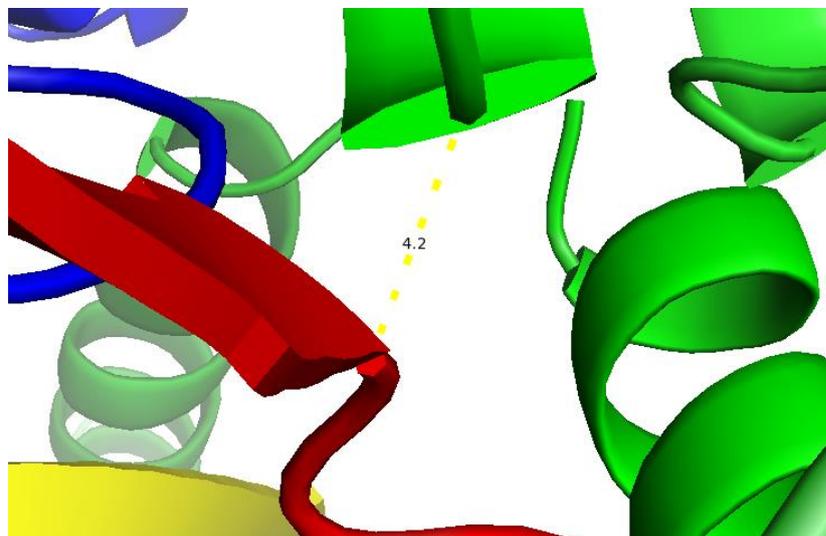


Figura 22. (A) Modelo de interação entre a proteína F pós-fusão e o nucleossomo, gerado pelo servidor PatchDock. A região de interação (vermelho) ocorre no sítio C da proteína F. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas proteínas. (C) Medida da região de interação entre a proteína F e o nucleossomo, gerado pelo servidor PatchDock.

Tabela 2. Valores e sítios de interação entre proteína F (pré e pós-fusão) e proteínas das NETs.

	<i>Pré-fusão</i>			<i>Pós-fusão</i>		
	Motavizumab	Elastase	Histona	Motavizumab	Elastase	Histona
Sítio de interação	Sítio A I	Sítio A Sítio C	N500	Sítio A	Sítio I	Sítio C
Energia de ligação	-11.31	-34.08	-27.68	-29.4	-36.01	-17.01
Score	14170	16330	10116	15372	15152	9426
Superfície de contato	2045.70	2051.00	1226.50	2052.80	2220.10	1715.20

Nossos resultados, associados àqueles da literatura, sugerem que as vias aéreas de indivíduos infectados pelo vírus hRSV, encontram-se obstruídas por uma grande quantidade de NETs (Cortjens et al., 2015), as quais foram estimuladas pelo próprio vírus, bem como sua proteína F (Funchal et al., 2015). A presença das NETs nas vias aéreas resulta em um delicado equilíbrio entre benefícios e prejuízos ao processo infeccioso em curso. Concentrações elevadas de NETs resultam em dano tecidual, ao passo que a presença reduzida delas pode promover a inibição da infecção pelo hRSV através da interação da proteína F viral com proteínas das NETs (elastase e histonas). Estas interações bloqueariam as funções da proteína F viral, afetando assim etapas iniciais do ciclo viral, como adesão e internalização, bem como na disseminação viral por inibir a fusão célula-célula, e, conseqüentemente, a formação de sincícios.

## 5. Conclusões

Em resumo, a conclusão geral do trabalho é que em concentrações baixas as NETs possuem uma promissora atividade anti-hRSV por agir em protocolo virucida, reduzindo o dano celular e a formação de sincícios causada pelo vírus. As interações entre proteína F do vírus e algumas proteínas encontradas nas NETs podem ser, ao menos parcialmente, responsáveis por tais efeitos.

Pontualmente, nossas conclusões foram:

- a) As NETs geradas sob o estímulo de PMA apresentam perfil eletroforético de proteína e ácido nucléico compatíveis com as NETs clássicas;
- b) As NETs apresentaram efeito citotóxico sobre células Hep-2 assumindo valor de  $CC_{50} > 67 \mu\text{g/ml}$ ;
- c) O ensaio virucida resultou em um alto valor para o índice de seletividade  $\cong 66$ ; e,
- d) As análises de *docking molecular* indicaram fortemente a formação de complexos estáveis entre elastase-proteína F e histonas-proteína-F, em ambos os estados da proteína viral.

## Referências

AL-KHAFAJI AB. et al. Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. **Molecular Medicine**, v. 22, 2016.

ALMYROUDIS, N. et al. NETosis and NADPH oxidase: at the Intersection of Host Defense, Inflammation and Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 45, 2013.

American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis: Diagnosis and management of bronchiolitis. **Pediatrics**, A current statement on the management of bronchiolitis: what works and what is not recommended, p. 1774-1793, 2006.

ANDRUSIER, N.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. FireDock: Fast Interaction Refinement in Molecular Docking. **Proteins**, v. 69, n. 1, p. 139-159, 2007.

ARNOLD, R.; KÖNIG, W. Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively Intercellular Adhesion Molecule-1 expression. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7359-7367, 2005.

BAINTON, D.F. Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, n. 1-2, p. 153-68, 1999.

BANERJEE, S.; STAMPLER, J.; FURTMÜLLER, P.G.; OBINGER, C. Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1814, p. 375–387, 2011.

BAREL, M. et al. A novel receptor—ligand pathway for entry of Francisella tularensis in monocyte-like THP-1 cells: Interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 145, 2008.

BAWAGE, S.S. et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. **Advances in Virology**, p. 595-768, 2013.

BENNETT, B. L. et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 10, p. 1532-40, 2007.  
BLACK, C. P. Systematic Review of the Biology and Medical Management of Respiratory Syncytial Virus Infection. **Respiratory Care**, v. 48, p. 209-233, 2003.

BONFIM, C.M. et al. Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 5, p. 439-44, 2011.

BORCHERS, A.T.; CHANG, C; GERSHWIN, M.E.; GERSHWIN, L.J. Respiratory syncytial virus—a comprehensive review. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 45, p. 331-379, 2013.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3503-21, 1997.

BOSSERT, B.; CONZELMANN, K.K. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. **Journal of Virology**, v. 76, p. 4287–4293, 2002.

BOSSERT, B.; MAROZIN, S.; CONZELMANN, K.K. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. **Journal of Virology**, v. 77, p. 8661–8668, 2003.

BOTOSSO, V.F. et al. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 1, e1000254, 2009.

BRANITZKI-HEINEMANN K, et al. Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 518, 2016.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 24, n. 36, 2010.

BRINKMANN, V. et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, 2004, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 577-82, 2007.

BUENO, S. M. et al. Host immunity during RSV pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1320-9, 2008.

BUKREYEV, A.; WHITEHEAD, S.S.; MURPHY, B.R.; COLLINS, P.L. 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. 7, n. 12, p. 8973-8982, 1997.

BYLER, D.M.; LEE, D.L.; RANDALL, C.S. Thermal Denaturation of Elastase in the Presence and Absence of Guanidinium Chloride: An IR Spectroscopic and DSC Investigation. **ACS Symposium Series**, v. 7, p. 145-158, 1999.

CHEN, Z. et al. Discovery and Characterization of Phage Display-Derived Human Monoclonal Antibodies against RSV F Glycoprotein. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

CHENG, X.; PARK, H.; ZHOU, H.; JIN, H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. **Journal of virology**, v. 79, n. 22, p. 13943-13952, 2005.

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.

COLLINS, P.L.; CHANOCK, R.M.; AMURPHY, B.R. **Respiratory syncytial virus**. In *Fields virology*. 4 ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2001, p. 1443–1486.

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.

COLLINS, P.L.; HILL, M.G.; CRISTINA, J.; GROSFELD, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, n. 1, p. 81-85, 1996.

COLLINS, P.L.; MELERO, J.A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. **Virus research**, v. 162, n. 1-2, p. 80-99, 2011.

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.

CORNELI, H.M. et al. A multicenter, randomized, controlled trial of dexamethasone for bronchiolitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 331-339, 2007.

CORTJENS, B. et al. Neutrophil Extracellular Traps Cause Airway Obstruction During Respiratory Syncytial Virus Disease. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 3, p. 401-411, 2015.

COXON, A. et al. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. **Immunity**, v. 5, n. 6, p. 653-66, 1996.

DOBSON, J.V. et al. The use of albuterol in hospitalized infants with bronchiolitis. **Pediatrics**, v. 101, n. 3, p. 361-368, 1998.

DOUDA DN, et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 112, n. 9, p. 2817-2822, 2015.

DRESCHER, B.; BAI, F. Neutrophil in Viral Infections, Friend or Foe? **Virus research**, v. 171, n. 1, p. 1-7, 2013.

DUDAS, A. R.; KARRON, A. R. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 430-439, 1998.

DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. **Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules**. In Gusfield et al., Ed. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Workshop on Algorithms in Bioinformatics(WABI) Rome, Italy, Lecture Notes in Computer Science, Springer Verlag, 2002, p. 185-200.

DWORSKI R, SIMON HU, HOSKINS A, YOUSEFI S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1260-1266, 2011.

EMBORIADOU, M. et al. Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 37, n. 1, p. 79-84, 2007.

FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1749-1759, 2005.

FALSEY, A.R.; SINGH, H.K.; WALSH, E.E. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 11, p. 1493-7, 2006.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 371-84, 2000.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E. Viral pneumonia in older adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 4, p. 518-440, 2006.

FLORES, G.; HORWITZ, R.I. Efficacy of beta2-agonists in bronchiolitis: a reappraisal and meta-analysis. **Pediatrics**, v. 100, p. 233-239, 1997.

FUCHS, T.A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cellular Biology**, v. 176, n. 2, p. 231-4, 2007.

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, e0124082, 2015.

GHILDYAL, R. et al. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 4, p. 753-757, 2002.

GONZALEZ-REYES, L. et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 98, n. 17, p. 9859-9864, 2001.

GRAHAM, B.S. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. **Vaccine**, v. 34, n. 30, p. 3535-3541, 2016.

GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**, 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GROSKREUTZ, D. J. et al. Respiratory Syncytial Virus Induces TLR3 Protein and Protein Kinase R, Leading to Increased Double-Stranded RNA Responsiveness in Airway Epithelial Cells. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, 1733-40, 2006.

GUIMARÃES-COSTA, A. et al. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2011.

GUPTA, C.K.; LESZCZYNSKI, J.; GUPTA, R.K.; SIBER, G.R. 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, 1996.

HALL, C.B.; WALSH, E.E.; LONG, C.E.; SCHNABEL, K.C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 4, p. 693-8, 1991.

HALVERSON, T.W.R et al. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, e1004593, 2015.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 669-83, 1997.

HEMMERS, S., et al., PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22043, 2011.

HIRSCH, J.G. Bactericidal action of histone. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 108, n. 6, p. 925-944, 1958.

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 : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 21, n. 2, p. 163-170, 2001.

HUANG, SHENG-YOU. Exploring the potential of global protein–protein docking: an overview and critical assessment of current programs for automatic ab initio docking. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 8, p. 969-977, Aug. 2015.

HUANG, k. et al. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8132-8140, Aug. 2010.

JAOVISIDHA, P. et al. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 5, p. 2916-20, Sep. 1999.

JIN H, ZHOU H, CHENG X, TANG R, MUNOZ M, NGUYEN N: 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.

JOHNSON, P.R.; SPRIGGS, M.K.; OLMSTED, R.A; COLLINS, P.L. 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**, v. 84, n. 16, p. 5625-5629, 1987.

JOHNSON, S. et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent *in vitro* and *in vivo* activity against respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 5, p. 1215–1224, 1997.

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.

KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 4, n. 1, p. 49–60, Feb. 2002.

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**, v. 94, n. 25, p. 13961-13966, 1997.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug. 1972.

KESHARI, R. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of ERK and p38 MAPK Mediates PMA-Induced NETs Release from Human Neutrophils. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, n. 3, p. 532-540, Mar. 2013.

KILLIKELLY, A.M.; KANEKIYO, M.; GRAHAM, B.S. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. **Scientific Reports**, v. 6, n. 34108, Sep. 2016.

KIM, J.Y.; CHANG, J. In Hot Pursuit of the First Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 809-816, 2016.

KURT-JONES, E.A. et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nature immunology**, v. 1, n. 5, p. 398-401, 2000.

LAY, M.K. et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. **Microbes Infection**, v. 15, n. 3, p. 230-42, 2013.

LENARD, J. Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family? **Virology**, v. 216, n. 2, p. 289-298, 1996.

LEUNG, A.K.C.; KELLNER, J.D.; DAVIES, D.H. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Journal of the National Medical Association**, v. 97, n. 12, p. 1708-13, Dec. 2005.

LILJEROOS, L.; KRZYZANIAKB, M.A.; HELENIUSB, A.; BUTCHERA, S.J. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, v.110, n. 27, p. 11133-11138, Jul. 2013.

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, Jul. 2005.

LONGHINI-DOS-SANTOS, N. et al. Cell Therapy with Bone Marrow Mononuclear Cells in Elastase-Induced Pulmonary Emphysema. **Stem Cell Reviews**, v. 9, n. 2, p. 210-218, Apr. 2013.

LUQUE, L.E.; RUSSELL, C.J. Spring-loaded heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. **Journal of Virology**, v. 81, p. 3130-3141, Jan. 2007.

LYU, S.Y.; HIM, J.Y.; PARK, W.B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex 525 virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. **Archives Pharmacol Research**, v. 28, n. 11, p. 1293-301, Nov. 2005.

MANDA, A.; PRUCHNIAK, M.P.; ARAŻNA, M.; DEMKOW, U.A. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. **Central European Journal of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 116–121, Apr. 2014.

MASHIACH, E. et al. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. **Nucleic Acids Research**, v. 36 (Web Server issue):W229-32, Jul. 2008.

MCLELLAN, J.S. et al. Structure of a Major Antigenic Site on the Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in Complex with Neutralizing Antibody 101F . **Journal of Virology**, v. 84, n. 23, p. 12236-12244, Dec. 2010.

MCLELLAN, J.S. et al. Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. **Science**, v. 342, n. 6158, p. 592-598, Nov. 2013.

MCLELLAN, J. S. et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1113-1117, May 2013.

MCLELLAN, J.S. et al. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 2, p. 248-250, Feb. 2010.

MCLELLAN, J.S.; RAY, W.C.; PEEPLES, M.E. Structure and Function of RSV Surface Glycoproteins. **Current topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 83-104, Oct. 2013.

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.

MEJIAS, A. et al. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. **Pediatric Infection Disease Journal**, v. 24, p. 189–96, Nov. 2005.

MEJIAS, A; RAMILO, O. Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. **Biologics : targets & therapy**, v. 2, n. 3, p. 433-439, Sep. 2008.

MELERO, J.A.; MAS, V. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. **Virus Research**, v. 209, p. 128-135, Nov. 2015.

MESA, M.A.; VASQUEZ, G. NETosis. **Autoimmune Diseases**, Feb. 2013.

MORIN, B.; KRANZUSCH, P.J.; RAHMEH, A.A.; WHELAN, S.P. The polymerase of negativestranded RNA viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 2, p. 103-110, Apr. 2013.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, Nov. 2008.

NOAH, T.L., et al. Chemokines and inflammation in the nasal passages of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Clinical Immunology**, v. 104, n. 1, p. 86-95, Jul. 2002.

NAJMEH, S. et al. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 16, n.98, Apr. 2015.

NAUSEEF, W.M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, v. 15, p. 602-611, Jun. 2014.

NORRBY, E.; MUFSON, M.A.; SHESBERADARAN, H. Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 12, p. 2721-2729, Dec. 1986.

OLSZEWSKA-PAZDRAK, B. et al. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 4756-64, Jun. 1998.

PANG, I.K; IWASAKI, A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. **Trends in immunology**, v. 32, n. 1, p. 34-41, Jan. 2011.

PASTEY, M.K.; CROWE, JR. J.E.; GRAHAM, B.S. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7262–70, Sept. 1999.

PAPAYANNOPOULOS, V.; METZLER, K.D.; HAKKIM, A.; ZYCHLINSKY, A. 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.

PEDERSEN F, et al. Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients. **Respiratory Medicine**, v. 109, n. 10, p. 1360-1362, Oct. 2015.

PETERS, T.R.; CROWE, J.E. **Respiratory syncytial virus**. In: Long SS, ed. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 3 ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2008, p. 1112-1117

PETRICEVICH, V.L.; MENDONCA, R.Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 2, p. 143-153, Aug. 2003.

PILSCZEK FH et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 185, n.12, p. 7413-7415, Dec 2010.

POLANSKI, A.; KIMMEL, M. Bioinformatics. **Springer**, p. 37–45, 2007.

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, Jun. 2013.

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.

RESCH, B.; MICHEL-BEHNKE, I. Respiratory syncytial virus infections in infants and children with congenital heart disease: update on the evidence of prevention with palivizumab. **Current Opinion in Cardiology**, v. 28, n. 2, p. 85-91, Mar 2013.

RIBEIRO-PAES, J.T. et al . Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, supl. 1, p. 140-148, May 2009.

RUSSELL, C.J.; JARDETZKY, T.S.; LAMB, R.A. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. **The EMBO Journal**, v. 20, n.15, p. 4024-4034, Aug. 2001.

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.

SAFFARZADEH, M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, Feb. 2012.

SAITOH, T., et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109-116, Jul 2012.

SALOMÃO JUNIOR, J.B. et al. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 3, p. 219-224, May 2011.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.R.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SCHLENDER, J. et al. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8234–8242, 2000.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acid Research**, v. 1, n. 33, W363-W367, Jul. 2005.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, Dec. 2005.

SIDWELL, R.W. Overview of viral agents in pediatric enteric infections. **Pediatric Infection Disease**, v. 5, n. 1, p.44-45, Jan 1986.

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, Oct. 2015.

SOUZA, P.S.S. et al. NETosis Induced by Trypanosoma cruzi Parasite, and Its Soluble Antigens, Occurs in the Absence of Classic Apoptosis and Necrosis Signs. **Global Journal of Parasitology**, v. 1, p. 29-37, Dec. 2015.

SPANN, K.M. et al., Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 4363–4369, Apr. 2004.

SPEHNER, D.; DRILLIEN, R.; HOWLEY, P.M. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 260-268, Jun. 1997.

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, Jul. 1991.

SRINIVASAKUMAR, N.; OGRA, P.; FLANAGAN, T. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. **Journal of virology**, v. 65, n. 8, p. 4063-4069, Aug. 1991.

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, Aug. 2001.

TERAN, L. M. et al. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 155, n. 4, p. 1362-1366, Apr. 1997.

THOMAS, P.G.; et al. NLRP3 (NALP3/CIAS1/Cryopyrin) mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 566-575, Apr. 2009.

THOMPSON, CB. **Apoptosis**. In: Paul, W.E., Ed. *Fundamental immunology*. 4ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p. 813-29.

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, Jul. 2014.

TIWARI, P.M. et al. Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial vírus infection in HEp-2 cells. **Journal of Microscopy**, v. 253, n. 1, p. 31-41, Jan. 2014.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil Extracellular Traps Capture and Kill *Candida albicans* Yeast and Hyphal Forms. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 668-676, Apr. 2006.

VAN SCHAİK, S. Respiratory syncytial virus affects pulmonary function in BALB/c mice. **Journal of Infection Diseases**, v. 177, n. 2, p. 269-276, Feb. 1998.  
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 Review**, v. 18, n.4, Oct. 2004.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade Molecular**. Porto Alegre, 2014. 282 p.

VOLLING, C. et al. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization in adults: a retrospective cohort study. **BMC Infection Diseases.**, v. 14, n. 1, p. 665, Dec. 2014

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; CHOW, A.O.; NIZET, V. Fetal calf serum contains heat-stable 515 nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5245-5246, Dec. 2009.

VOROBJEVA, N.V.; PINEGIN, B.V. Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 79, n.12, p. 1286-96, Dec. 2014.

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, Jul. 1983.

WALSH, E.E.; PETERSON, D.R.; FALSEY, A.R. Risk Factors for Severe Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly Persons. **Journal of Infection Disease**, v. 189, n. 2, p. 233-238, Jan. 2004.

WANG, Y. et al. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1124–1133, Mar. 2011.

WANG, Y. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **The Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 2, p. 205-213, Jan. 2009.

WARDINI, A.B. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **The Journal of General Virology**, v. 91(Pt 1), p. 259-64, Jan. 2010.

WEINRAUCH, Y. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. **Nature**, v. 417, p. 91–94, May 2002.

WRIGHT, M.; PIEDIMONTE, G. Respiratory syncytial virus prevention and therapy: Past, present, and future. **Pediatric Pulmonology**, v. 46, n. 4, p. 324–347, Apr. 2011.

WU, H. et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 3, p. 652-665, May 2007.

WU, H.; et al. Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 317, p. 103–123, 2008.

YIPP, B.G.; KUBES, P. NETosis: how vital is it? **Blood**, v. 122, n. 16, p. 2784-2794, Oct. 2013.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death and differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438-1444, Nov. 2009.

YU, K.L. et al. Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity *in vivo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n.5, p. 1115-1122, Mar. 2006.

ZHANG, B. et al. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28443-54, Aug. 2003.

ZHANG, W. et al. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. **Nature Medicine**, v. 11, n. 1, p. 56-62, Jan. 2005.

ZHU, J. et al. Design and analysis of post-fusion 6-helix bundle of heptad repeat regions from Newcastle disease virus F protein. **Protein Engineering**, v. 16, n. 5, p. 373-379, May 2003.

ZIMMER, G.; TROTZ, I.; HERRLER, G. N-Glycans of F Protein Differentially Affect Fusion Activity of Human Respiratory Syncytial Virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 10, p. 4744-4751, May 2001.

## Anexo A

### Coloração para gel de poliacrilamida por nitrato de prata

#### 1ª solução:

40 mL de metanol

9,6 mL de ácido acético (obs.: glacial – mais puro e sempre adicionar o ácido acético na água, e não o contrário)

30,4 mL de água destilada

40 µL de formol (colocar só na hora do uso) formaldeído 37%

Tempo: 10 minutos ou overnight (colocar na mesa agitadora)

Lavar 3x com água destilada (por 1 minuto cada lavagem e mexer)

#### 2ª solução:

100 mL de etanol

100 mL de água destilada

Dividir esta solução em 3 para lavar 3x de 10 minutos cada (colocar na mesa agitadora).

Lavar 3x com água destilada.

#### 3ª solução:

100 mL de água destilada

0,03g de tiosulfato de sódio

Tempo: 10 minutos (colocar na mesa agitadora).

Lavar 3x com água destilada.

#### 4ª solução:

100 mL de água destilada

0,2g de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$  – colocar só na hora do uso)

70 µL de formol (colocar só na hora do uso)

Tempo: 10 minutos (colocar na mesa agitadora).

Lavar 3x com água destilada.

5º solução:

100 mL de água destilada

6g de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

50 µL de formol (colocar só na hora do uso)

Tempo: revelação, assim que aparecerem as bandas, lavar o gel 3x com água destilada (rapidamente para não borrar as bandas).

6ª solução:

40 mL de metanol

9,6 mL de ácido acético

30,4 mL de água destilada

Tempo: 5 minutos

Esta solução serve para bloquear a reação

Obs.: o gel pode ser guardado nessa solução na geladeira

7ª solução:

50 mL de metanol

50 mL de água destilada

Tempo: 5 minutos para fixar e corar

Colocar água destilada e agitar para reidratar o gel por 5 a 10 minutos. 611

## **Anexo B**

### **Protocolo para eletroforese em gel de agarose**

#### Preparação do gel de agarose

Gel de Agarose a 1.5%

Agarose – 0,75g

TBE 1X q.s.p. – 50ml

Aquecer a mistura até que esta fique homogênea. Deixar esfriar e vertê-la na placa onde 619 o gel irá polimerizar.

#### Preparação do gel de agarose para a aplicação das amostras

1. Após a preparação do gel, colocá-lo em uma cuba e adicionar o tampão TBE até cobrir totalmente o gel e os eletrodos.
2. Proceder à preparação das amostras para a aplicação no gel:
3. Ao término, fechar a cuba e conectá-la na fonte.
4. Ajustar a voltagem para 100V e observar a corrida.
5. Observar o DNA na luz ultravioleta.

## Anexo C

Versão preliminar do manuscrito seguindo as instruções da Revista BMC Microbiology.

(<http://www.biomedcentral.com/bmcmicrobiol/authors/instructions/researcharticle>)

### **NETs possuem promissora atividade anti-hRSV através de sua interação com a proteína F viral**

Priscila Silva Sampaio Souza<sup>a,\*</sup>, Lia Vezanfard Barbosa<sup>a</sup>, Larissa Figueiredo Alves Diniz<sup>a</sup>, Pedro Miyadaira Ribeiro Souza<sup>a</sup>, Gabriela Campos de Araujo<sup>bc</sup>, Diogo Pessoa<sup>a</sup>, Juliana de Oliveira<sup>a</sup>, Fátima Pereira Souza<sup>bc</sup>, Karina Alves Toledo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista – UNESP (FCLAssis), Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista – UNESP (IBILCE, São José do Rio Preto), Brasil

<sup>c</sup>Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB), Universidade Estadual Paulista – UNESP (IBILCE, São José do Rio Preto), Brasil,

\*Autor Correspondente: Priscila Silva Sampaio Souza, Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis/SP, Brasil. Tel: + 55-18-3302-5848; E-mail: priscilasampaiosouza@gmail.com

#### E-mail dos autores:

Priscila Silva Sampaio Souza – priscilasampaiosouza@gmail.com

Lia Vezanfard Barbosa – lia.vezanfard@gmail.com

Larissa Figueiredo Alves Diniz - laridiniz9@gmail.com

Pedro Miyadaira Ribeiro Souza - pmiyadaira@outlook.com

Gabriela Campos Araujo – bicamposaraujo@hotmail.com

Diogo Pessoa – diogo.pessoa@gmail.com

Juliana de Oliveira – juliana@assis.unesp.br

Fátima Pereira Souza – fatyssouza@gmail.com

Karina Alves Toledo – karinafcla@gmail.com

## RESUMO

**Introdução:** O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) é um dos principais agentes etiológicos das doenças do trato respiratório inferior, sendo responsável pela internação hospitalar de crianças e idosos. Até o momento, os tratamentos são apenas paliativos e não há vacina disponível. As vias aéreas de pacientes infectados com hRSV apresentam intenso infiltrado de neutrófilos, responsáveis pela liberação das Neutrophil extracellular traps (NETs). As NETs são estruturas extracelulares compostas por DNA associado a proteínas intracelulares que são eficientes na captura e eliminação de diversos microrganismos, incluindo alguns vírus. O hRSV induz a liberação das NETs no tecido pulmonar de indivíduos infectados, mas as consequências fisiopatológicas desse evento ainda não foram elucidadas. O objetivo deste estudo foi investigar através de ensaios *in vitro* e *in silico* o impacto das NETs na infecção por hRSV. **Resultados:** NETs, geradas por neutrófilos estimulados com phorbol myristate acetate (PMA), apresentaram longos fragmentos de DNA e perfil eletroforético sugestivo da presença de proteínas classicamente associadas às NETs (elastase, catepsina G, mieloperoxidase e histonas). A presença das NETs (> 2 µg/ml) em cultura de células Hep-2 apresentou citotoxicidade celular menor que 50%. A prévia incubação (1h) das partículas virais (MOIs 0.1, 0.5 e 1.0) com as NETs (2-32 µg/ml) resultou em proteção celular da morte induzida pelo vírus em células Hep-2. Paralelamente, houve redução na formação de sincícios que está relacionada a uma menor disseminação viral pelo tecido infectado. Resultados de ensaios de interação *in silico* demonstraram alta energia de ligação entre as proteínas elastase e histonas das NETs com a proteína F do envelope viral do hRSV. As interações ocorreram em sítios importantes para a neutralização e coordenação do processo de infecção/replicação do hRSV. **Conclusão:** Nossos resultados mostram que a presença das NETs diminui os danos celulares induzidos pelo hRSV, possivelmente por uma ação direta na captura de partículas virais e/ou na interferência da atividade de fusão da proteína F.

**Palavras-chave:** Redes Extracelulares dos Neutrófilos, Vírus Sincicial Respiratório, *Docking Molecular*

## INTRODUÇÃO

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) é um dos principais agentes etiológicos de infecções do trato respiratório inferior em recém-nascidos, crianças e idosos, podendo causar bronquiolite, bronquite, pneumonia e infecções pulmonares obstrutivas crônicas [1, 2]. Dentre as medidas de prevenção disponíveis atualmente está a administração do anticorpo Palivizumab. No entanto, o custo da administração desta droga é muito elevado e ela vem sendo usada apenas na imunização de crianças de alto risco [3, 4].

Células epiteliais das vias aéreas infectadas *in vitro* com hRSV, produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação e o recrutamento de células do sistema imune [5], causando transmigração elevada de neutrófilos para o local [6, 7]. Neutrófilos são encontrados nas vias aéreas de pacientes infectados por hRSV que desenvolveram doença pulmonar [8, 9]. Devido intensa replicação viral e influxo leucocitário, as vias respiratórias podem ser bloqueadas pela produção excessiva de muco, edema e debris celulares [10], piorando o estado clínico do paciente.

Neutrófilos presentes no sítio de infecção liberam as NETs (*neutrophil extracellular traps*) que são compostas por DNA associado a proteínas intracelulares (granulares, nucleares e citoplasmáticas), tais como elastase, histonas e mieloperoxidase. As NETs possuem ação microbicida na captura e/ou morte de diversos patógenos [11], incluindo alguns vírus [12, 13]. Embora a ação microbicida das NETs tenha sido descrita para diversos patógenos, o seu papel benéfico tem sido questionado em diversas doenças humanas infecciosas e não infecciosas. A presença excessiva das NETs pode causar danos teciduais e acelerar a progressão de algumas doenças, incluindo doenças pulmonares [14].

O papel dos neutrófilos nas infecções por hRSV ainda não foi elucidado. As vias aéreas de pacientes com hRSV apresentam acúmulo de muco rico em DNA [15]. Foi demonstrado que a proteína F do hRSV é capaz de induzir a liberação das NETs [16]. A proteína F é responsável por mediar a fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, permitindo assim a infecção, e a fusão de células infectadas com células adjacentes, levando à formação de sincícios, células gigantes multinucleadas, uma característica citopática do hRSV [17].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel das NETs durante a infecção *in vitro* por hRSV. Ensaios *in silico* analisaram possíveis interações de componentes das NETs (elastase e histonas) com a proteína F. Em resumo, as NETs apresentaram efeito citotóxico em menos de 50% das células. A incubação das NETs com o vírus reduziu o dano celular induzido pela infecção viral associada à diminuição no número de sincícios formados. As interações obtidas *in silico* demonstram alta energia de ligação entre as proteínas elastase e

histonas com a proteína F-hRSV em sítios importantes para a neutralização da infecção/replicação do vírus. Os dados obtidos indicam que as NETs podem ter uma ação direta na captura de partículas virais do hRSV e/ou na interferência da atividade da proteína F de fusão.

## **MÉTODOS**

### **Cultura Celular**

Células HEp-2 (carcinoma de orofaringe, permissivas à infecção e replicação do vírus hRSV) [21], obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Glass Works, Nova York, NY, USA) incubadas em estufa umedecida (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) e meio de cultura DMEM F12 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

### **Estoque viral**

O vírus hRSV, cepa Long, cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Professor Livre-docente de Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP) foi inoculado em culturas de células HEp-2. Os estoques virais foram preparados em meio de cultivo DMEM F12 incompleto (não acrescido de SFB). Após a coleta do estoque viral, as alíquotas foram congeladas em DMEM F12 acrescido de trealose 10% e mantidas em freezer a -80°C até o momento do uso [21]. O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise [22] e confirmado pelo ensaio de TCDI50 [23].

### **Purificação e estimulação de neutrófilos humanos para geração das NETs**

Neutrófilos humanos foram isolados e estimulados de acordo com a metodologia descrita por Brinkmann et.al., 2010 [24], com modificações [25, 26]. Sangue periférico de voluntários declarados sadios foi coletado na presença de heparina sódica e separado por Histopaque 1077 e 1119 (Sigma). O sedimento de células foi ressuspensão em DMEM F12 sem FBS e contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany). Os neutrófilos foram então estimulados por phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA – Sigma) (50 nM) diluído em DMEM F12 sem FBS. A ausência de FBS se faz necessária em virtude da presença de DNase em sua composição, as quais poderiam degradar as NETs [27]. Após incubação em estufa umidificada (3 horas, 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) o sobrenadante foi descartado e as NETs foram coletadas e incubadas

em banho-maria à 40 °C por 24 horas. As amostras foram alíquotadas e armazenadas em freezer -25 °C. Para quantificação do DNA presente nas amostras foi utilizado o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Inc, Grand Island, NY, USA) através do kit PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen).

### **Visualização das NETs por microscopia de fluorescência**

Neutrófilos isolados foram adicionados em placa de 24 poços ( $2 \times 10^5$ /poço) contendo lamínulas tratadas com poli-L-lisina 0.01% (Sigma). As células foram estimuladas com PMA (50 nM) por 3h em estufa umidificada (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). Células não estimuladas foram usadas como controle negativo da produção das NETs. As lamínulas foram montadas em ProLong Gold contendo DAPI (Invitrogen). Vinte e quatro horas depois, as amostras foram então submetidas à captura de imagens em microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse Ti acoplado em câmera digital Nikon Sight.

### **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Para análise do perfil eletroforético proteico, alíquotas de NETs (12.5-50 µg/ml), diluídas em tampão de amostra Laemmli (Sigma), foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e 20%, preparados de acordo com o protocolo de Green e Sambrook, 2012 [28]. Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc, 205 CA, USA) foi usado como controle do peso molecular. Ao final da corrida os géis foram corados com Nitrato de Prata.

### **Eletroforese em gel de agarose**

Para análise do perfil eletroforético de DNA, alíquotas de NETs foram centrifugadas a 10,000 rpm por 10 minutos e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1.5%. DNA ladder de 1kb foi usado como padrão de peso molecular (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). O gel foi corado com GelRed (1:10,000) (Biotium, Hayward, CA, USA) e as imagens foram visualizadas e capturadas em transiluminador de ultravioleta com fotodocumentador.

### **Avaliação enzimática da mieloperoxidase**

Em uma placa de 96 poços foram adicionadas em triplicata 50 µl/poço de NETs (27 µg/ml) que tenham sido incubadas em banho-maria por 24 horas à 40 °C. NETs não incubadas em banho-maria e denominadas NETs fresca também foram testadas. Meio de cultura, livre de células, foi usado como controle negativo da reação. Cada poço recebeu 100 µL de substrato 3',5',5'-tetrametilbenzidina (TMB, Wiener lab, Rosário, SF, Argentina).

Após 1 hora de incubação (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>), a reação foi paralisada com solução de ácido sulfúrico 1N. A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer) à 405 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem da atividade de mieloperoxidase, assumindo como 100% de atividade os valores de absorbância apresentados pela solução de NETs não incubada à 40 °C (NETs frescas). As NETs frescas foram coletadas imediatamente após 3h de estímulo por PMA e incubadas com 500mU/ml de micrococcal nuclease (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) por 10min à 37 °C. As NETs frescas foram quantificadas após adição de EDTA (5mM) para que a digestão fosse finalizada [29]. Foram incluídas no ensaio, amostras de NETs incubadas em banho-maria por 24 horas à 37 °C.

#### **Determinação da citotoxicidade celular**

Células HEp-2 na presença de meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10% foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas para que atingissem confluência  $\geq 80\%$ . O meio de cultura foi substituído por diferentes concentrações de NETs (0-67  $\mu\text{g/ml}$ ) diluídas em DMEM F12 livre de FBS. A cultura foi mantida por 4 dias em estufa umidificada (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). A viabilidade das células HEp-2 foi avaliada no quarto dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT [1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, Thiazolyl blue formazan] seguindo as recomendações do fabricante (Sigma). A absorbância da solução foi lida (560 nm) em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer) e os valores foram convertidos em porcentagem de células. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular cultivado na ausência das NETs como 100% de viabilidade.

#### **Infecção por hRSV *in vitro***

Células HEp-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços (5x10<sup>4</sup>/poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com FBS 10%. O ensaio foi realizado como descrito por Petricevich e Mendonca, 2003 [30], com algumas modificações. As suspensões de hRSV, (0.1, 0.5 e 1 MOI; Multiplicity of infection), foram incubadas (1h, 4 °C) na presença de diferentes concentrações de NETs (0-64  $\mu\text{g/ml}$ ). Ao final da incubação, o meio de cultura dos poços foi substituído pelas alíquotas virais tratadas ou não com as NETs para nova incubação (2 horas, 37 °C). O inóculo viral foi então descartado e poços foram incubados por 4 dias em estufa umidificada (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) na presença de DMEM F12 livre de soro. A viabilidade celular foi avaliada no quarto dia através de ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT (como descrito acima), e a leitura de absorbância foi realizada em aparelho de espectrofotometria a 560 nm. Os ensaios incluíram grupos

controle de células não tratadas e não infectadas (controle celular) e um outro grupo de células não tratadas e infectadas com o vírus (controle viral). Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular como 100% de viabilidade. A porcentagem de proteção obtida em cada tratamento foi calculada como se segue:

$$\text{Equação (1)} \quad \text{Proteção Celular} = \frac{DO_{AT} * 100}{DO_{CC100}}$$

Onde:

DO é a densidade óptica após leitura do sal de MTT em 560 nm;

DO<sub>AT</sub> é a densidade óptica obtida para cada uma das amostras-teste - DO<sub>CCV</sub> (densidade óptica do controle viral) e

DO<sub>CC100</sub> é DO<sub>CC</sub> - DO<sub>CV</sub> (densidade óptica do controle celular - densidade óptica do controle viral).

### **Análise Estatística**

Os dados experimentais foram processados com o auxílio dos *softwares* Microsoft Excel e Graphpad Prism 6 e avaliados por análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Foi considerado um nível de significância de  $p \leq 0.05$ . As repetições de cada experimento estão indicadas em cada figura respectiva.

### **Docking molecular**

Estruturas tridimensionais de elastase neutrofílica ([PDB ID 3Q76](#)), histonas (nucleossomo) ([PDB ID 3AFA](#)), anticorpo motavizumab ([PDB ID 3IXT](#)) e proteína F pré-fusão ([PDB ID 4JHW](#)) e pós-fusão ([PDB ID 3RRR](#)) foram obtidas no banco de dados Protein Data Bank. Os procedimentos de *docking molecular* foram realizados pela plataforma online PatchDock [31] e o dados gerados foram refinados pelo servidor online FireDock [32, 33]. Os parâmetros para os dockings foram mantidos padrão, com um valor de RMSD = 4. Os complexos e os dados obtidos foram analisados com o auxílio do *software* de interface gráfica PyMOL, assim como as imagens geradas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Geração das NETs por neutrófilos estimulados por PMA

As NETs geradas sob o estímulo de PMA (50 nM; 3h) foram avaliadas morfológicamente por microscopia de fluorescência, e quanto ao seu perfil eletroforético, em géis de agarose e de poliacrilamida. Neutrófilos não estimulados não apresentaram liberação de NETs, enquanto que neutrófilos estimulados com PMA apresentaram estruturas extracelulares coradas por DAPI, um intercalante fluorescente de DNA (**Figura 1**). O DNA presente nas NETs é descondensado, íntegro e possui predominância de carga negativa, podendo aprisionar patógenos e impedir sua disseminação [34]. A análise do perfil eletroforético de DNA em gel de agarose, revelou a presença de fragmentos longos e homogêneos de DNA, maiores que 10,000 pares de base (**Figura 2A**). Dentre as proteínas descritas como componentes das NETs podemos citar as histonas, elastase, mieloperoxidase, dentre outras [25, 35]. O conteúdo protéico das NETs geradas neste estudo foi analisado em géis de poliacrilamida de 12% e 20% (**Figura 2B e C**). A coloração com nitrato de prata do gel 12% destacou a presença de 3 proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 75, 50 e 30 kDa. Com base na composição protéica das NETs e no peso molecular apresentado pelas bandas no gel, podemos sugerir que elas correspondam a elastase (28.5 kDa), catepsina G (28.8 kDa) e mieloperoxidase (73.8-87.2 kDa) (**Figura 2B**). O aumento na concentração de acrilamida no gel proporcionou a observação de bandas com peso molecular de aproximadamente 15 kDa, o que sugere que essas proteínas possam ser histonas (11-15 kDa) (**Figura 2C**). Estes resultados demonstraram que, em nossas mãos, as estruturas liberadas pelos neutrófilos, estimulados por PMA, apresentaram morfologia e conteúdo (DNA e proteínas) compatíveis com aqueles já descritos na literatura. Tais parâmetros foram de suma importância para a execução dos próximos ensaios.

### NETs aquecidas à 40 °C mantém sua atividade em relação à temperatura fisiológica humana

Após a coleta do sobrenadante rico em NETs foi possível observar a presença de grandes aglomerados de material esbranquiçado, semelhante a algodão, que foram visualmente identificados como DNA. Para que este material fosse dissolvido sem o uso de DNAase, o mesmo foi mantido por 24h em banho-maria à 40 °C. O uso de DNAase resultaria na obtenção de fragmentos menores de DNA, podendo interferir na captura do vírus pelas NETs [36]. A atividade enzimática da proteína mieloperoxidase foi monitorada como forma de avaliar se o aquecimento das amostras à 40 °C prejudicaria a função biológica das NETs. NETs frescas foram assumidas como 100% da atividade enzimática de mieloperoxidase

**(Figura 3).** A incubação das NETs em banho-maria por 24 horas à 37 ou 40 °C resultou uma queda na atividade enzimática de 43.76% e 45.36%, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre a atividade enzimática das NETs aquecidas à 37 ou 40 °C. Este resultado teve uma grande relevância biológica tendo por base a temperatura fisiológica humana de 37 °C. Dentre os principais componentes das NETs, as histonas começam a apresentar mudanças na sua estrutura a partir de aproximadamente 65 °C [37], a elastase começa a sofrer desnaturação a partir de 59 °C [38], enquanto que a mieloperoxidase é uma enzima que possui estabilidade estrutural em temperaturas de até 80 °C [39]. De acordo com Wallace et al. [40] o DNA possui uma melting temperature ( $T_m$ ), temperatura à qual metade da sequência de bases está desnaturada, de 76,2 °C, começando a sofrer desnaturação por volta de 70 °C [41]. Estes dados demonstram que o aquecimento das amostras à 40 °C não é prejudicial para o efeito biológico das NETs e, conseqüentemente, não afetará a análise dos resultados aqui apresentados.

#### **Citotoxicidade celular das NETs em células HEp-2**

Antes que o efeito das NETs pudesse ser avaliado durante a infecção de células Hep-2 pelo hRSV, foi necessário investigar seu efeito citotóxico sobre estas células. Diferentes concentrações de NETs (0.06 – 67 µg/ml) foram incubadas com células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ ) e a viabilidade destas células foi avaliada após 4 dias de cultivo em meio DMEM-F12 livre de FBS (**Figura 4**). Células não incubadas com as NETs foram assumidas como 100% de viabilidade. As NETs demonstraram efeito citotóxico de maneira dose-dependente, assim como demonstrado por Saffarzadeh et al., 2012 [26], e causaram morte celular estatisticamente significativa em concentrações  $\geq 2$  µg/ml, ocasionando até 32% de morte celular em comparação ao controle. Nenhuma das concentrações testadas resultou em morte superior a 50% das células, nem mesmo a maior concentração de 67 µg/ml. Saffarzadeh et al., 2012 analisaram a influência das NETs em células epiteliais (MLE-12 e AT-II) e endoteliais (A549, HPAEC e HUVEC) e apontaram que as histonas são as principais responsáveis pelo dano celular induzido pelas NETs. Compostos com promissora ação antiviral são caracterizados por apresentar um Índice de Seletividade (IS)  $\geq 4$  [42, 43], sendo calculado com base na determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) e a concentração eficiente do composto que protege 50% das células durante uma infecção (CE<sub>50</sub>), assim, IS = CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>. Face aos resultados obtidos, podemos indicar que as NETs apresentam uma CC<sub>50</sub> > 67 µg/ml.

#### **NETs apresentam ação anti-hRSV**

Agentes antivirais podem apresentar efeito inibitório sobre a infecção em virtude de efeitos diretos ou indiretos sobre células e/ou partícula viral. Estudos tem demonstrado a capacidade das NETs inibirem infecção através de sequestro ou neutralização da partícula viral [44]. Através da sua rede de DNA as NETs podem capturar as partículas virais, impedindo que cheguem à célula alvo [16, 17] ou neutralizar a partícula viral através da ação de suas proteínas, como MPO [16], defensinas [45, 46] e histonas [16, 47]. Após a avaliação citotóxica das NETs em células HEP-2, o efeito delas no curso da infecção *in vitro* por hRSV foi avaliado. Previamente à infecção, diferentes MOI's (0.1, 0.5 e 1) foram incubados por 1 hora à 4 °C com diferentes concentrações de NETs (0.5-64 µg/ml). Após 4 dias de cultivo, a viabilidade celular foi determinada pela adição do sal de MTT (**Figura 5**). A morfologia das células e a formação de sincícios também foi analisada microscopicamente, após 3 dias de cultivo, em todos os tratamentos (**Figuras 5-8**).

A incubação do inóculo viral MOI 0.1 com as NETs resultou em proteção celular superior a 50% em concentrações <16µg/ml, possuindo proteção mais efetiva e significativa estatisticamente em concentrações maiores (2-8 µg/ml). A proteção celular diminuiu com o aumento na concentração das NETs (>32µg/ml), levando a um maior dano celular e queda da viabilidade (**Figura 5A**). Observamos ainda, que nas concentrações de >2µg/ml, houve redução de mais de 50% na contagem de sincícios (**Figura 5B**). Concentrações aumentadas de NETs (≥32 µg/ml) reduziram fortemente o número de sincícios ao passo que o dano celular também foi agravado (**Figura 5A e B**). A presença de NET 64 µg/ml resultou em dano celular intenso do que aquele causado pela infecção viral (controle viral). Na análise morfológica (**Figura 6**), células do controle viral apresentaram morfologia alongada, redução numérica e presença elevada de sincícios. Baixas concentrações de NETs (0.5 e 1 µg/ml) apresentaram uma alta contagem de sincícios. No entanto, estes mostraram tamanho reduzido sendo, por isso, de difícil visualização nas imagens apresentadas. Para as concentrações de NETs que foram efetivas na proteção de dano celular (<8 µg/ml), observa-se grande diminuição do número de sincícios em relação ao controle viral, sendo que os sincícios nestas condições apresentaram um tamanho reduzido. Nas concentrações mais elevadas de NETs (≥16 µg/ml) observa-se uma crescente ausência de células aderentes no poço e diminuição na formação de sincícios que apresentaram dimensões maiores do que aqueles observados até o momento.

O inóculo viral (MOI) foi aumentado com o intuito de aprofundarmos o efeito protetor das NETs. Assim, verificamos resultados semelhantes àqueles obtidos com MOI 0.1 ao testarmos um inóculo 5x maior (MOI 0.5) (**Figura 5**). NETs (1-8 µg/ml) mantiveram um mínimo de 50% de proteção celular, incluindo redução no número de sincícios (**Figura 5C e D**). Concentrações ≥16 µg/ml não foram consideradas efetivas, uma vez que reduziram o

número de sincícios em detrimento da redução do número de células viáveis e do tamanho dos sincícios formados (**Figura 7**).

O aumento do inóculo viral para MOI 1 (10 vezes maior) resultou em redução acentuada dos efeitos anti-hRSV das NETs. Nenhuma das concentrações de NETs testadas foi capaz de evitar ou reverter os danos celulares causados pela infecção viral, não apresentando nenhuma proteção estatisticamente significativa (**Figura 5E**). A falta de proteção celular em MOI 1 pode indicar um efeito inibitório limitado das NETs em situações em que a carga viral se encontra elevada. Apesar de não ter sido observada proteção celular de acordo com o ensaio de viabilidade, a contagem de sincícios nesta condição apresentou valores significativos na diminuição dos focos virais em relação ao controle viral, sendo que as concentrações de 2 e 4 µg/ml foram as mais efetivas nessa redução (**Figura 5F**). No entanto, a análise morfológica das células (**Figura 8**), demonstra que em todas as concentrações houve grande redução no número de células aderentes ao poço, presença de células alongadas, além de uma grande presença de sincícios, sendo que nas concentrações mais elevadas de NETs (32 e 64 µg/ml) os sincícios apresentaram tamanho extenso. A presença simultânea do vírus e das NETs na cultura celular parecem agravar o efeito citotóxico individual de cada um, resultando em um número menor de células e conseqüentemente um número menor de sincícios mas que apresentam dimensões aumentadas.

Os dados obtidos indicam ação anti-hRSV das NETs, em determinadas concentrações (2-8 µg/ml), com efeito direto sobre as partículas virais, sugerindo que haja interação física entre o vírus e a estrutura de DNA/proteínas. O efeito observado na redução de sincícios nas concentrações de 2-4 µg/ml, sem aumento da morte celular, pode indicar alguma interferência das NETs na fusão celular proporcionada pela proteína viral F, mas sem inibir diretamente a replicação viral, mas sim a dispersão do vírus, uma vez que a fusão celular proporcionada pela proteína F se apresenta como um dos mecanismos efetivos na sua dispersão.[48]. O efeito virucida das NETs se mostrou fortemente dependente da carga viral. Cortjens et al., 2015 [15] demonstraram que partículas virais de hRSV (MOI 0.03-0.4), na presença de neutrófilos ativados, são capturadas pelas NETs prevenindo assim a infecção viral de células. Os benefícios observados quanto à presença das NETs com relação ao vírus hRSV devem ser analisados com cuidado já que uma intensa resposta neutrofílica pode contribuir para a patologia desta infecção viral. Durante nossas análises, a presença das NETs (> 16 µg/ml), mesmo que em concentrações menores que a CC<sub>50</sub> (67 µg/ml), resultou em maior dano celular quando na presença do vírus. A presença das NETs no tecido pulmonar de indivíduos infectados pelo hRSV tem sido apontada como um dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na obstrução e dano tecidual das vias aéreas.

Estes mecanismos contribuem para a diminuição da capacidade de ventilação do indivíduo, reação ao tratamento e qualidade de vida [15, 16].

### **Componentes das NETs interagem em sítios conhecidos da proteína F viral**

*Docking molecular* foi utilizado na complementariedade da investigação e interpretação dos dados experimentais *in vitro*, sendo avaliada a interação entre algumas proteínas que compõem as NETs (elastase e histonas) com a proteína F do hRSV. A proteína F foi utilizada em seus ambos estados conformacionais, de pré- e pós-fusão, pois ambos se encontram presentes na superfície da partícula viral, compartilhando cerca de 50% da superfície do vírus [49, 50]. A proteína F do hRSV é descrita como fundamental para a infecção viral [51, 52, 53], e recentemente foi descrita pela sua capacidade em estimular a liberação das NETs [16]. Dentre as moléculas componentes das NETs, o DNA apresenta alto poder de captura de patógenos em virtude do seu tamanho e características físico-químicas. Tal efeito é aumentado e melhorado pela presença de várias proteínas como elastase e histonas. As histonas são as proteínas em maior abundância presentes nas NETs e juntamente com a elastase regulam a formação das NETs, exercendo posteriormente papel microbicida [11, 54, 55].

A estrutura do anticorpo motavizumab (PDB ID 3IXT), de interação já conhecida com a proteína F, foi obtida para servir de comparação com outros complexos gerados. O *docking molecular* entre o motavizumab e o trímero da proteína F, resultou em interação do anticorpo no sítio A da proteína F em ambas as conformações, como descrito na literatura [56] (**Figura 9**). O anticorpo motavizumab interage com o sítio A (sítio II) da proteína F que neutraliza a fusão do vírus com a célula [57]. A energia obtida nas interações foi de -11.31 kcal/mol, na conformação pré-fusão, e de -29.4 kcal/mol na conformação pós-fusão. O modelo gerado apontou um alto *score* (14170), pré-fusão, e *score* (15372), pós-fusão.

Os resultados de *docking molecular* entre proteína F, em ambas as conformações, e elastase, demonstram interações entre estas proteínas, com uma energia de ligação de -34,08 kcal/mol, pré-fusão, e de -36,01 kcal/mol, para pós-fusão (**Figura 10 e 11**). A energia obtida demonstra alta estabilidade do complexo gerado em comparação com o complexo proteínaF-motavizumab. Os *scores* (16330) e (15152), pré e pós-fusão respectivamente, dos modelos gerados também foram superiores, indicando grande probabilidade dos complexos formados serem viáveis. Apesar dos complexos em ambas as conformações terem resultados com valores similares, os sítios de interação obtidos foram em diferentes regiões. A região de interação, apontada pelos resultados obtidos de *docking* da elastase com a proteína F pré-fusão (**Figura 10**) se localiza muito próxima do sítio A (II) (sítio de

interação para o motavizumab), e do sítio C (IV e V) (sítios de interação com o anticorpo 101F) [56], indicando que o complexo gerado pode resultar em inibição da atividade de fusão da partícula viral contribuindo assim na ação antiviral das NETs. A interação da elastase com a proteína F pós-fusão (**Figura 11**) se localiza no sítio I da proteína viral, um sítio de interação conhecido por se ligar ao anticorpo 131-2a, entre outros anticorpos, mas que gera uma fraca neutralização da atividade viral e preferencialmente no estado de pós-fusão [50].

A neutralização da proteína F pelo sítio A e pelo sítio C pode levar à inibição da atividade de fusão do vírus com a célula do hospedeiro, ao passo que a neutralização da proteína F pelo sítio I pode levar à inativação de fusão célula-célula em células infectadas. Todas as interações, nos sítios A, C e I, foram similarmente próximas e estáveis, de acordo com os valores gerados pelo *docking* molecular. Se a elastase realmente age nesses sítios, ela poderia ser uma das responsáveis pela proteção celular observada no ensaio virucida ao inibir a formação de sincícios e a disseminação do vírus. A elastase é uma das proteínas das NETs com maior potencial citotóxico [55, 58]. A presença aumentada de NETs no tecido e consequentemente de elastase poderia auxiliar na redução da carga viral e da formação dos sincícios, mas isso também poderia implicar em maior dano celular.

Os resultados de interação entre as histonas e a proteína F pré-fusão também gerou resultados promissores (**Figura 12**), com uma energia de -27.68 kcal/mol e *score* (10116), indicando que possa existir uma forte interação entre estas proteínas (Figura 21A-C). A interação entre histonas e proteína F pós-fusão (**Figura 13**) resultou em uma energia de -17,01 kcal/mol e *score* (9426). A maior energia observada nesta interação (pós-fusão) indica uma maior estabilidade do complexo histonas-proteína F na conformação pré-fusão, sugerindo uma melhor ação das histonas sob o vírus nessa situação. A região mais próxima de interação do complexo nucleossomo-proteína F pré-fusão ocorreu em uma região de glicosilação (n500) da proteína F, de grande importância para a ação de fusão do vírus [59]. Quando esta região sofre mutação, a atividade de fusão do vírus, assim como a formação de sincícios cai em aproximadamente 90% [59]. A interação do complexo nucleossomo-proteína F pós-fusão ocorreu no sítio C, assim como na interação com elastase. A exemplo do complexo elastase-proteína F, a interação das histonas na região n500 e no sítio C, juntamente com o DNA, poderia resultar em ação antiviral das NETs por interferir em fases iniciais do ciclo viral (adesão/internalização), na formação de sincícios, ou na criação de barreiras físicas que impediriam a interação da proteína F com a membrana plasmática da célula

A presença das NETs nas vias aéreas resulta em um delicado equilíbrio entre benefícios e prejuízos ao processo infeccioso em curso. Concentrações elevadas de NETs resultam em dano tecidual, ao passo que a presença reduzida delas pode promover a captura e a inibição da infecção pelo hRSV através da interação da proteína F viral com proteínas das NETs (elastase e histonas). Estas interações bloqueariam as funções da proteína F viral, afetando assim etapas iniciais do ciclo viral, como adesão e internalização, bem como na disseminação viral por inibir a fusão célula-célula, e, conseqüentemente, a formação de sincícios.

### **CONCLUSÃO**

Em conclusão, demonstramos que em baixas concentrações as NETs possuem uma promissora atividade anti-hRSV por agir em protocolo virucida, apresentando um alto índice de seletividade (IS = 66), e reduzindo o dano celular e a formação de sincícios causada pelo vírus. As interações entre proteína F do vírus e algumas proteínas encontradas nas NETs, elastase e histonas, podem ser, ao menos parcialmente, responsáveis por tais efeitos agindo na neutralização do vírus. Entretanto, nossos estudos e outros recentes sugerem que as vias aéreas de indivíduos infectados pelo vírus hRSV, encontram-se obstruídas por uma grande quantidade de NETs, as quais foram estimuladas pelo próprio vírus, podendo contribuir com a imunopatologia observada em crianças infectadas com hRSV [15, 16]. Além de ampliar o entendimento sobre o papel das NETs durante uma infecção viral e sua relação com o hRSV, esses resultados demonstram que há a necessidade de abordagens experimentais e clínicas para modular os efeitos prejudiciais das NETs em doenças pulmonares. A amplificação desses estudos pode contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias de combate ao hRSV, ajudando a reduzir as infecções e a controlar a doença, principalmente em imunocomprometidos

## REFERÊNCIAS

1. HALL, C.B.; WALSH, E.E.; LONG, C.E.; SCHNABEL, K.C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.*, 1991, 163, 693-8.
2. VOLLING, C; HASSAN, K; MAZZULLI, T, et al. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization in adults: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.*, 2014, 14, 665.
3. HUANG, k. et al. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion, 2010, 84(16), 8132-8140.
4. YU, K.L. et al. Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity *in vivo*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16, 1115-1122.
5. OLSZEWSKA-PAZDRAK, B. et al. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol*, 1998, 72(6), p. 4756-64.
6. ARNOLD, R.; KÖNIG, W. Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively Intercellular Adhesion Molecule-1 expression. *J. Immunol.*, 2005, 174. 7359.
7. RZEPKA, J. P.; HAICK, A. K.; MIURA, T. A. Virus-Infected Alveolar Epithelial Cells Direct Neutrophil Chemotaxis and Inhibit Their Apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46. 833–841.
8. TERAN, L. M. et al. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 1997, 155, 1362.
9. VAN SCHAİK, S. Respiratory syncytial virus affects pulmonary function in BALB/c mice. *J. Infect. Dis.*, 1998, 177. 269.
10. 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 : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2001, 21(2), 163-170.11. BRINKMANN, V. et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, 303(5663), p. 1532-5.
12. SAITOH T, KOMANO J, SAITOH Y, MISAWA T, TAKAHAMA M, et al. (2012) Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 12: 109–116. 16.

13. JENNE CN, WONG CH, ZEMP FJ, MCDONALD B, RAHMAN MM, et al. (2013) Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* 13: 169–180.
14. PORTO BN, STEIN RT. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Frontiers in Immunology*. 2016;7:311.
15. CORTJENS, B.; DE BOER, O.J.; DE JONG, R.; ANTONIS, A.F.G.; SABOGAL PIÑEROS, Y.S.; LUTTER, R. et al. Neutrophil Extracellular Traps Cause Airway Obstruction During Respiratory Syncytial Virus Disease. *J Pathol*, 2016.
16. FUNCHAL, G.A., et al. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4–Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124082.
17. COLLINS, P.L.; CHANOCK, R.M.; AMURPHY, B.R. Respiratory syncytial virus. In *Fields virology*. 4th edition, 2001, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1443–1486.]
18. DRESCHER, B.; BAI, F. Neutrophil in Viral Infections, Friend or Foe? *Virus research*, 2013, 171(1), 1-7.
19. THOMAS, P.G.; DASH, P.; ALDRIDGE, J.R. et al. NLRP3 (NALP3/CIAS1/Cryopyrin) mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity*, 2009, 30(4), 566-575.
20. PANG, I.K; IWASAKI, A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends in immunology*, 2011, 32(1):34-41.
21. GUPTA, C.K.; LESZCZYNSKI, J.; GUPTA, R.K.; SIBER, G.R. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. *Vaccine*, 1996, 14(15):1417-1420.
22. MCKIMM-BRESCHKIN, J.L. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining. *Journal of virological methods*, 2004, 120(1):113-117.
23. RASMUSSEN, L.; MADDOX, C.; MOORE, B.P. et al. A high-throughput screening strategy to overcome virus instability. *Assay and drug development Technologies*, 2011, 9(2):184-190.
24. BRINKMANN, V.; LAUBE, B.; ABU ABED, U. et al. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. *J. Vis.*, 2010; Exp., e1724.
25. NAJMEH, S.; COOLS-LARTIGUE, J.; GIANNIAS, B. et al. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. *J. Vis.*, 2015; Exp., e52687.

26. SAFFARZADEH, M.; JUENEMANN, C.; QUEISSER, M.A. et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE*, 2012; 7: e32366.
27. VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; CHOW, A.O.; NIZET, V. Fetal calf serum contains heat-stable 515 nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. *Blood.*, 2009, 114: 5245-5246.
28. GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
29. SOUSA-ROCHA, D.; THOMAZ-TOBIAS, M.; DINIZ, L.F.A. et al. Trypanosoma cruzi and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0139569.
30. PETRICEVICH, V.L.; MENDONCA, R.Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 2003, 42(2):143-153.
31. DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In Gusfield et al., Ed. *Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics(WABI) Rome, Italy, Lecture Notes in Computer Science*, 2002, pp. 185-200, Springer Verlag.
32. MASHIACH, E.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; ANDRUSIER, N. et al. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36 (Web Server issue):W229-32.
33. ANDRUSIER, N.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. FireDock: Fast Interaction Refinement in Molecular Docking. *Proteins*, 2007, 69(1):139-159.
34. HALVERSON, T.W.R; WILTON, M.; POON, K.K.H. et al. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. Weiss D, ed. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(1):e1004593.
35. MANDA, A.; PRUCHNIAK, M.P.; ARAŽNA, M.; DEMKOW, U.A. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent Eur J Immunol.*, 2014; 39: 116–121.
36. BARRIENTOS L, MARIN-ESTEBAN V, DE CHAISEMARTIN L, et al. An Improved Strategy to Recover Large Fragments of Functional Human Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:166. doi:10.3389/fimmu.2013.00166.
37. WEISCHET WO, TATCHELL K, VAN HOLDE KE, KLUMP H. Thermal denaturation of nucleosomal core particles. *Nucleic Acids Research*. 1978;5(1):139-160.

38. BYLER, D.M.; LEE, D.L.; RANDALL, C.S. Thermal Denaturation of Elastase in the Presence and Absence of Guanidinium Chloride: An IR Spectroscopic and DSC Investigation. ACS Symposium Series, 1999, 7:145-158.
39. BANERJEE, S.; STAMPLER, J.; FURTMÜLLER, P.G.; OBINGER, C. Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2011, 1814: 375–387.
40. Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucleic Acids Res 1979;6(11):3543-3557
41. Wang X, Lim HJ, Son A. Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. Environmental Health and Toxicology. 2014;29:e2014007. doi:10.5620/eht.2014.29.e2014007.
42. SIDWELL, RW, Overview of viral agents in pediatric enteric infections. Pediatr Infect Dis., 1986; 5: S44-5.
43. LYU, S.Y.; HIM, J.Y.; PARK, W.B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex 525 virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. Arch Pharm Res., 2005; 28: 1293-526 301.
44. Jenne CN, Kubes P. Virus-Induced NETs – Critical Component of Host Defense or Pathogenic Mediator? Spindler KR, ed. PLoS Pathogens. 2015;11(1):e1004546. doi:10.1371/journal.ppat.1004546.
45. Salvatore M, Garcia-Sastre A, Ruchala P, Lehrer RI, Chang T, et al. (2007) alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s). J Infect Dis 196: 835–843. 21. Doss M, White MR, Tecle T, Gantz D, Crouch EC, et al. (2009)
46. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D. J Immunol 182: 7878–7887.
47. Hoeksema M, Tripathi S, White M, Qi L, Taubenberger J, Van Eijk M, et al. Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. Innate Immun (2015) 21:736–45
48. PASTEY, M.K.; CROWE, JR. J.E.; GRAHAM, B.S. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. J Virol, 1999; 73: 7262–70
49. LILJEROOS, L.; KRZYZANIAKB, M.A.; HELENIUSB, A.; BUTCHERA, S.J. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. PNAS, 2013, 110, 27, 11133-11138.

50. KILLIKELLY, A.M.; KANEKIYO, M.; GRAHAM, B.S. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Sci. Rep.* 6, 2016, 34108.
51. MCLELLAN, J.S.; CHEN, M.; JOYCE, M.G. et al. Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *Science*, 2013, 592-598.
52. GRAHAM, B.S. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come *Vaccine*, Volume 34, Issue 30, Pages 3535-3541.
53. CHEN, Z.; ZHANG, L.; TANG, A. et al. Discovery and Characterization of Phage Display-Derived Human Monoclonal Antibodies against RSV F Glycoprotein. *PLoS ONE*, 2016, 11(6):
54. HIRSCH, J.G. Bactericidal action of histone. *The Journal of Experimental Medicine*, 1958, 108(6):925-944.
55. PAPAYANNOPOULOS, V.; METZLER, K.D.; HAKKIM, A.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 2010, 191(3), 677-691.
56. McLellan JS, Yang Y, Graham BS, Kwong PD. Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *Journal of Virology*. 2011;85(15):7788-7796. doi:10.1128/JVI.00555-11.
57. MCLELLAN, J.S.; CHEN, M.; KIM, A. et al. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. *Nature structural & molecular biology*, 2010, 17(2):248-250.
58. WEINRAUCH, Y.; DRUJAN, D.; SHAPIRO, S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, 2002, 417, 91–94.
59. ZIMMER, G.; TROTZ, I.; HERRLER, G. N-Glycans of F Protein Differentially Affect Fusion Activity of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 2001, 75(10):4744-4751

## .LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. NETs induzidas pela estimulação por PMA. Neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) (seta branca) foram incubados (3 horas) apenas com meio DMEM-F12 livre de SFB, como controle negativo (A) ou com PMA 50 nM (B). As lamínulas foram montadas em Prolong Gold contendo DAPI e as imagens capturadas em câmera acoplada a um microscópio invertido de fluorescência. As NETs podem ser observadas pela coloração azul, como fibras longas extracelulares (ponta da seta branca). As imagens são representativas de dois ensaios independentes realizados em triplicata.

Figura 2. Análise eletroforética dos componentes das NETs. O tamanho e a homogeneidade do DNA nas NETs (134  $\mu\text{g/ml}$ ) foram avaliados em gel de agarose 1.5% (A) M1 = Marcador molecular de DNA (1kb DNA ladder) . As amostras foram coradas com GelRed e as imagens visualizadas e capturadas em transiluminador ultravioleta com fotodocumentador. A composição proteica das NETs (setas pretas) foi avaliada em gel de poliacrilamida 12% (B) e 20% (C) após coloração com Nitrato de Prata. M2 = Marcador molecular de proteína (10 – 250 kDa). 1 – 3 = Alíquotas de NETs (12.5 – 50  $\mu\text{g/ml}$ ) As imagens são representativas de 3 experimentos.

Figura 3. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase. NETs que passaram por etapa de banho-maria à 37°C, 40°C e NETs fresca (sem aquecimento) foram incubadas com substrato de mieloperoxidase (100  $\mu\text{l/poço}$ ) por 1 hora. A leitura da absorbância gerada foi realizada em aparelho de espectrofotometria à 405nm. Meio de cultura (DMEM F12) foi usado como controle negativo e NETs fresca foi assumida como controle positivo (100% de atividade). O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. O resultado é a média dos valores obtidos  $\pm$  desvio padrão.

Figura 4. Determinação da CC50 das NETs em células Hep-2. Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$ ) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de NETs (0-67  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 4 dias à 37 °C. A viabilidade das células foi avaliada através do ensaio de MTT. A absorbância obtida em 560nm foi convertida em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular (NET 0  $\mu\text{g/ml}$ ) como 100% de viabilidade. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. A curva é o resultado da média dos valores obtidos  $\pm$  desvio padrão.

Figura 5. Determinação da CE50 das NETs sobre hRSV. Efeito virucida das NETs (0.5-64  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre hRSV (MOI's 0.1,0.5 e 1) pela avaliação da % de proteção celular (A, C, E)

e da formação do número de sincícios (B, D, F). O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. A curva é o resultado da média dos valores obtidos  $\pm$  desvio padrão.

Figura 6. Morfologia de células HEp-2 infectadas por hRSV (MOI 0.1) com diferentes tratamentos de NETs (0.5-64  $\mu\text{g/ml}$ ), avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40X.

Figura 7. Morfologia de células HEp-2 infectadas por hRSV (MOI 0.5) com diferentes tratamentos de NETs (0.5-64  $\mu\text{g/ml}$ ), avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40X.

Figura 8. Morfologia de células HEp-2 infectadas por hRSV (MOI 1) com diferentes tratamentos de NETs (0.5-64  $\mu\text{g/ml}$ ), avaliada e documentada por microscópio de luz branca em aumentos de 40X.

Figura 9. Interação entre a proteína F e motavizumab, gerado pelo servidor PatchDock. (A) Modelo da interação entre proteína F pré-fusão e motavizumab. A região de interação (roxo) ocorre no sítio A da proteína F. Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (B) Distâncias ( $\text{\AA}$ ) entre as regiões de interação entre a proteína F pré-fusão e motavizumab, mensuradas pelo visualizador PyMol. (C) Modelo da interação entre proteína F pós-fusão e motavizumab. A região de interação (roxo) ocorre no sítio A da proteína F. Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (D) Distâncias ( $\text{\AA}$ ) entre as regiões de interação entre a proteína F pós-fusão e motavizumab, mensuradas pelo visualizador PyMol.

Figura 10. Modelo da interação entre a proteína F pré-fusão e elastase, gerado pelo servidor PatchDock. (A) As regiões de interação (roxo) (vermelho) ocorrem nos sítios A e C da proteína F, respectivamente. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (C) Distância entre as regiões de interação entre a proteína F pré-fusão e a elastase, mensuradas pelo visualizador PyMol.

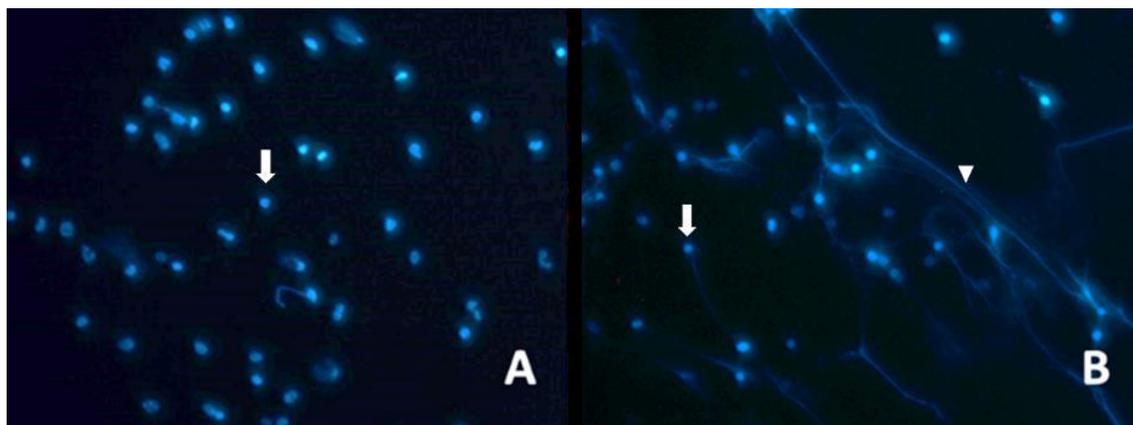
Figura 11. Modelo da interação entre a proteína F pós-fusão e elastase, gerado pelo servidor PatchDock. (A) A região de interação (laranja) ocorre no sítio I da proteína F. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas duas proteínas. (C)

Distância entre os *backbones* das regiões de interação entre a proteína F pós-fusão e elastase, mensurada pelo visualizador PyMol.

Figura 12. Modelo da interação entre a proteína F pré-fusão e histonas (nucleossomo), gerado pelo servidor PatchDock. (A) A região de interação (vermelho) ocorre na região de glicosilação n500 da proteína F. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas proteínas. (C) Distância entre os *backbones* das regiões de interação entre a proteína F e o nucleossomo, mensurada pelo visualizador PyMol.

Figura 13. Modelo da interação entre a proteína F pós-fusão e histonas (nucleossomo), gerado pelo servidor PatchDock. (A) A região de interação (vermelho) ocorre no sítio C da proteína F. (B) Modelo de superfície onde é possível ver o complexo formado pelas proteínas. (C) Distância entre os *backbones* das regiões de interação entre a proteína F pós-fusão e o nucleossomo, mensurada pelo visualizador PyMol.

**FIGURA 1**



**FIGURA 2**

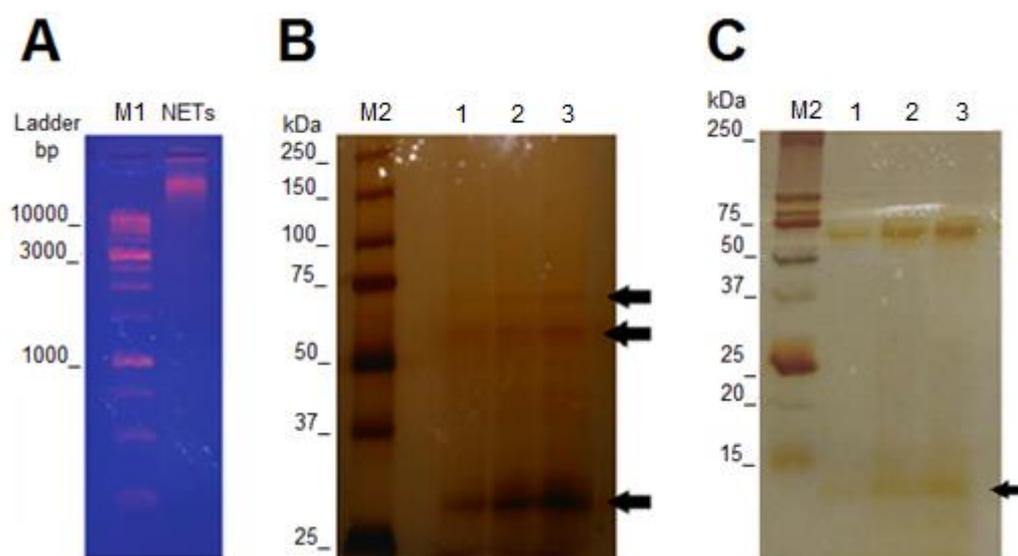


FIGURA 3

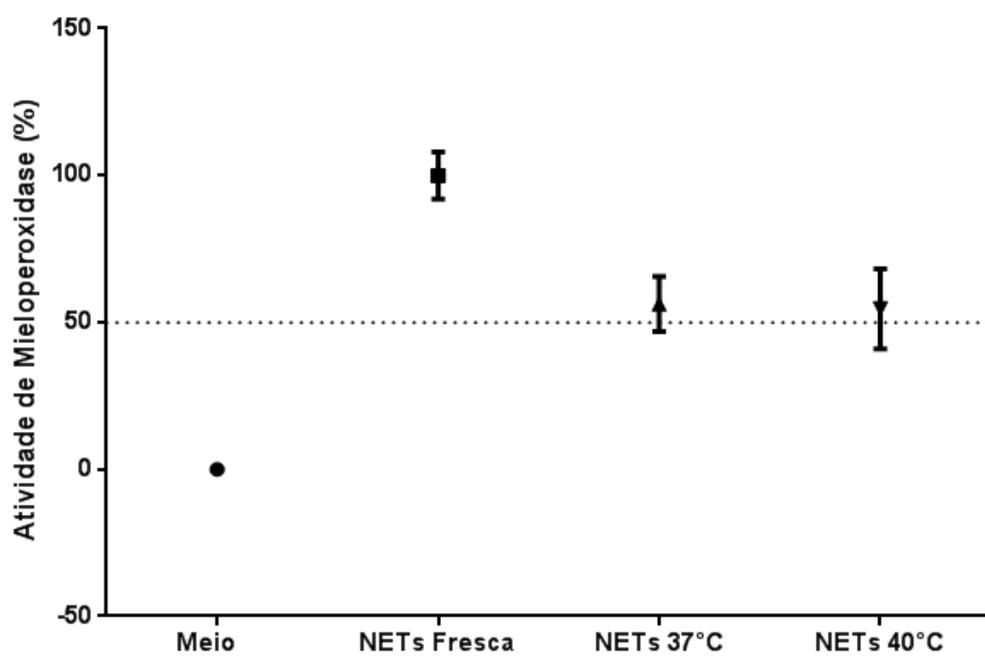
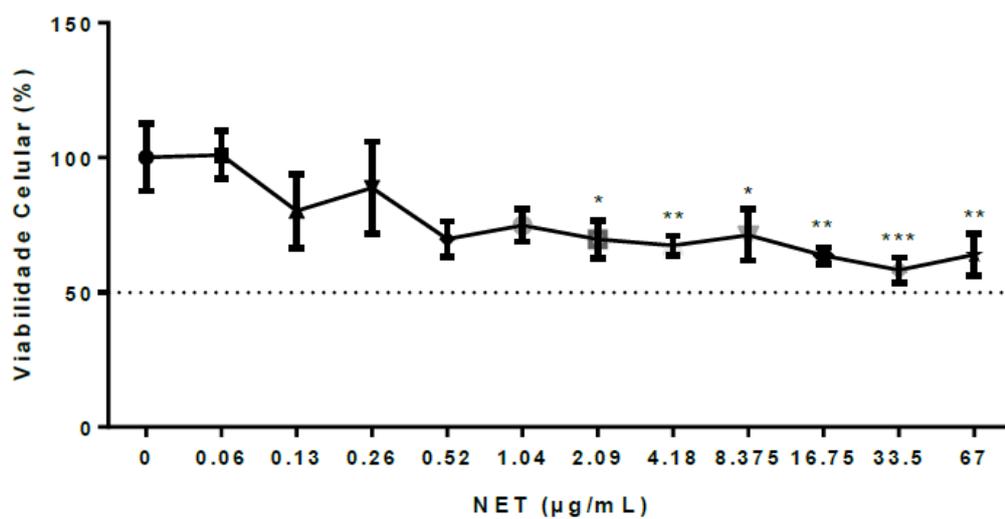
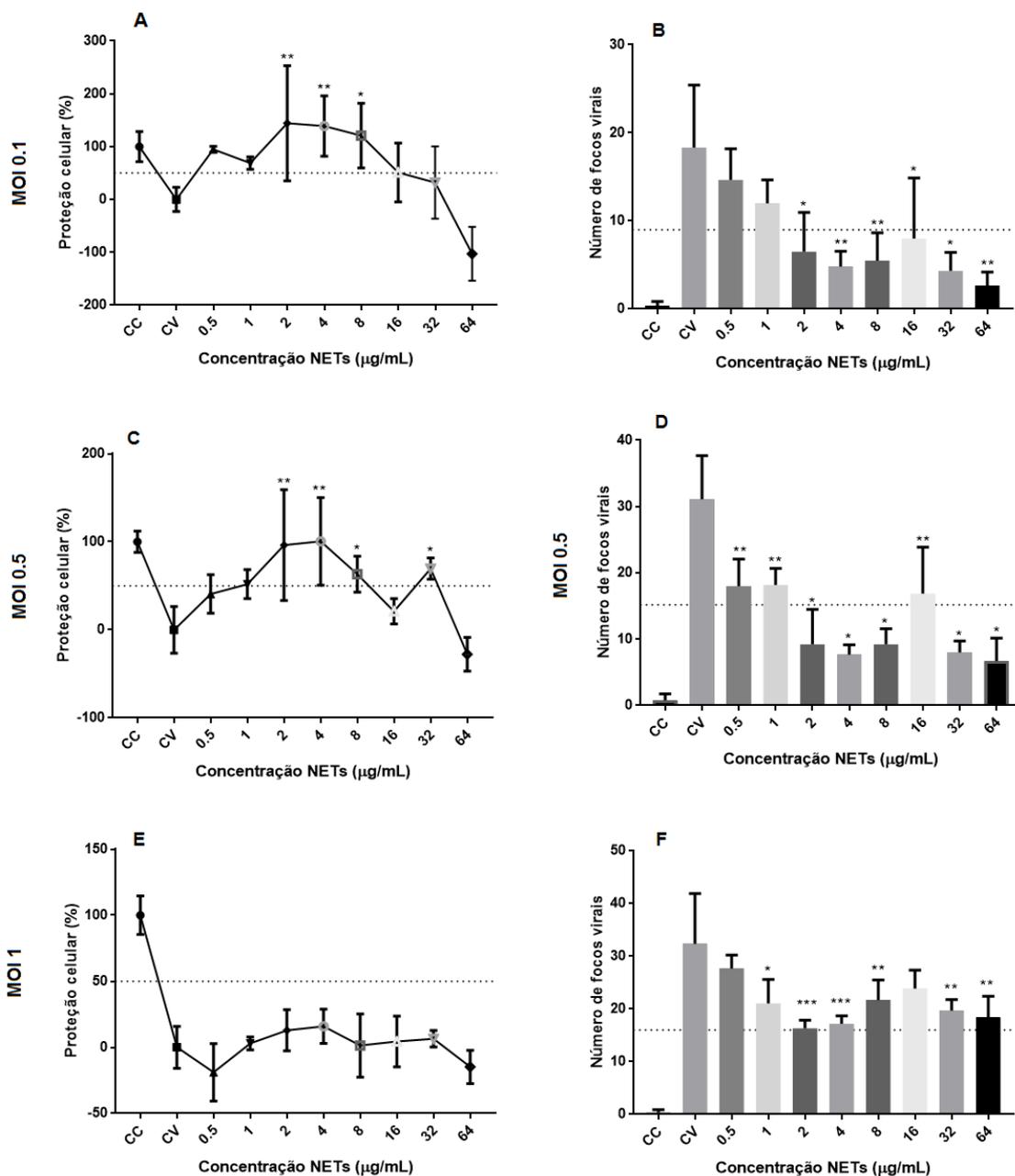


FIGURA 4



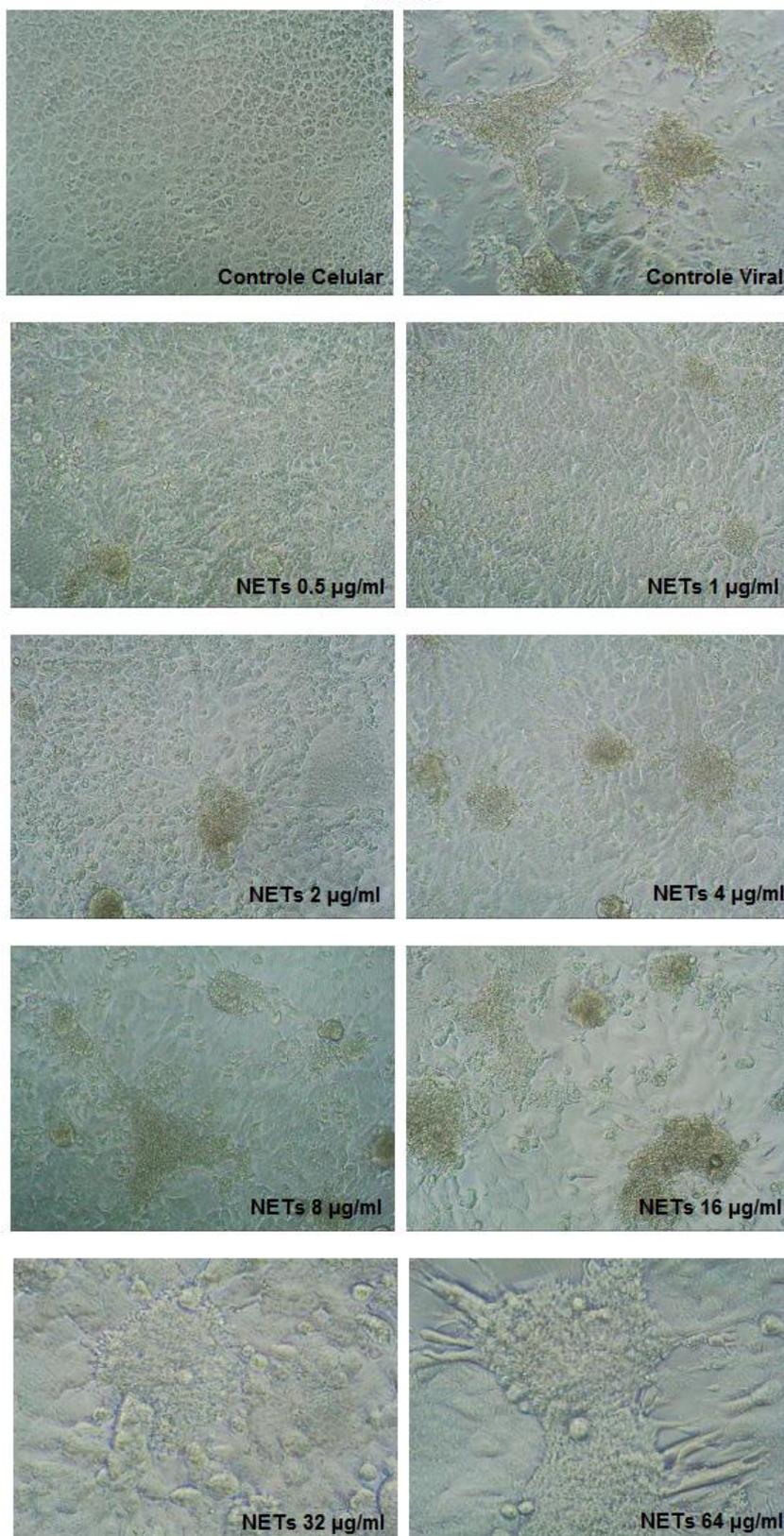
**FIGURA 5**

**Virucida**



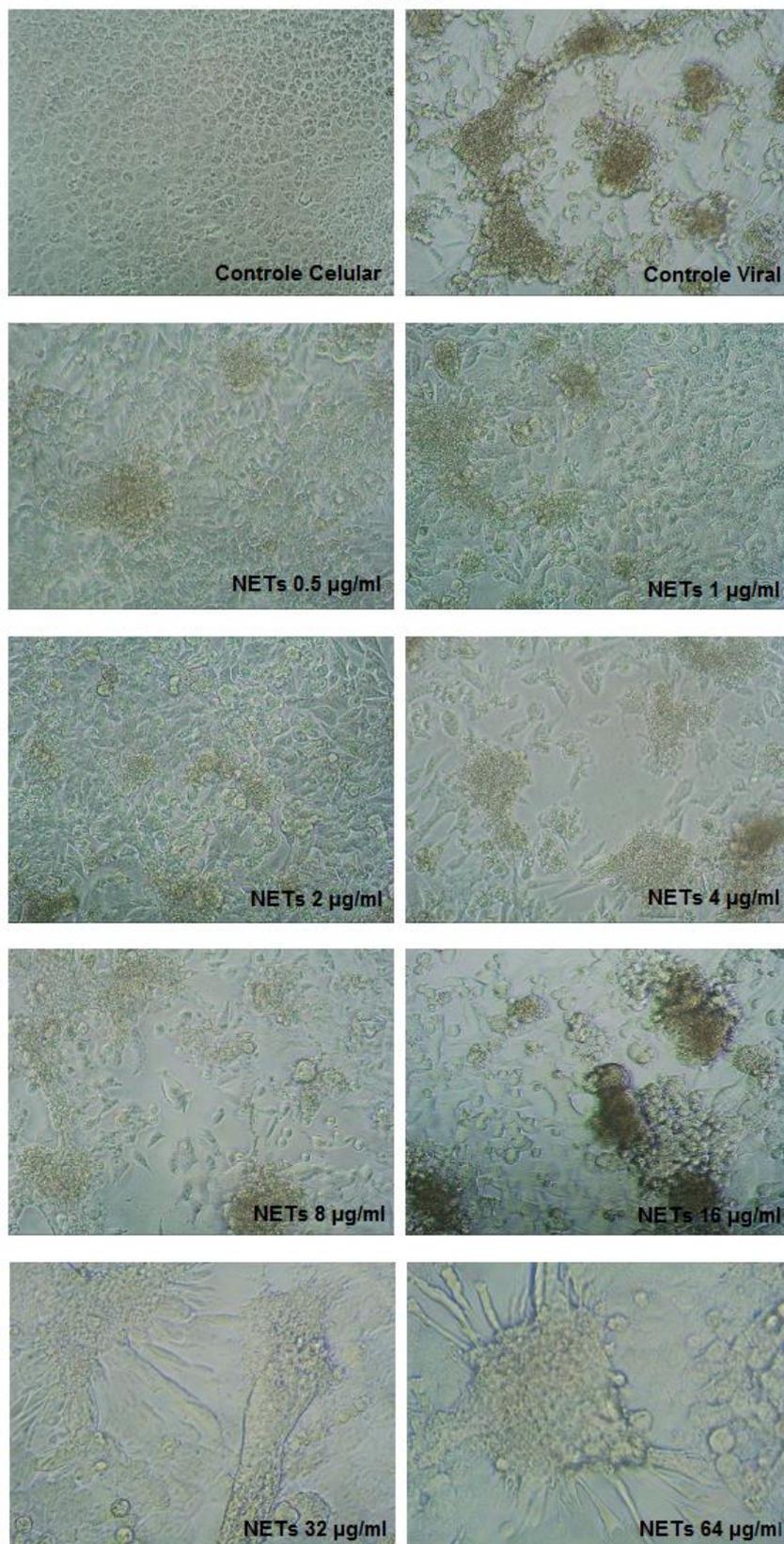
**FIGURA 6**

**Virucida  
MOI 0.1**



**FIGURA 7**

**Virucida  
MOI 0.5**



**FIGURA 8**

**Virucida  
MOI 1**

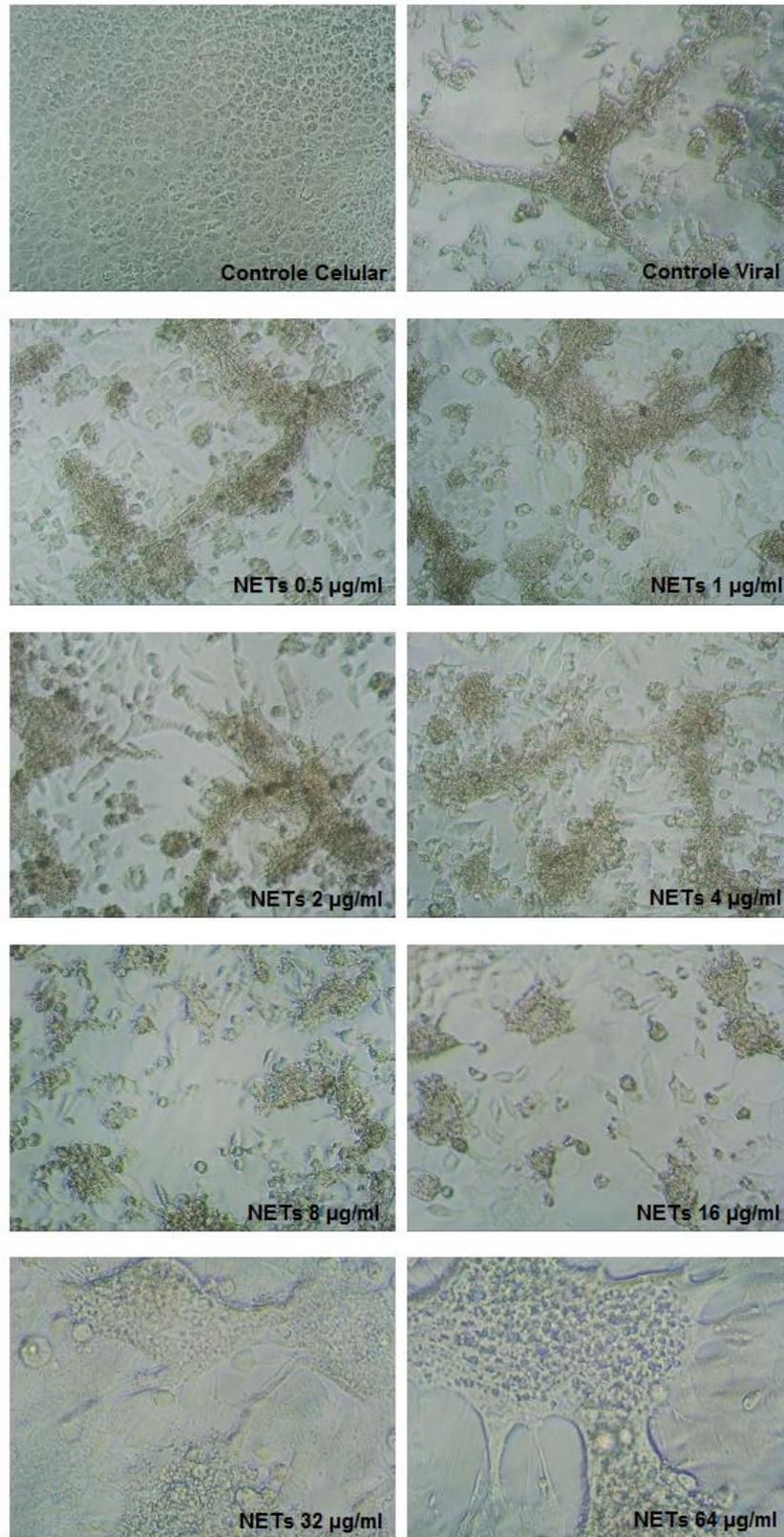


FIGURA 9

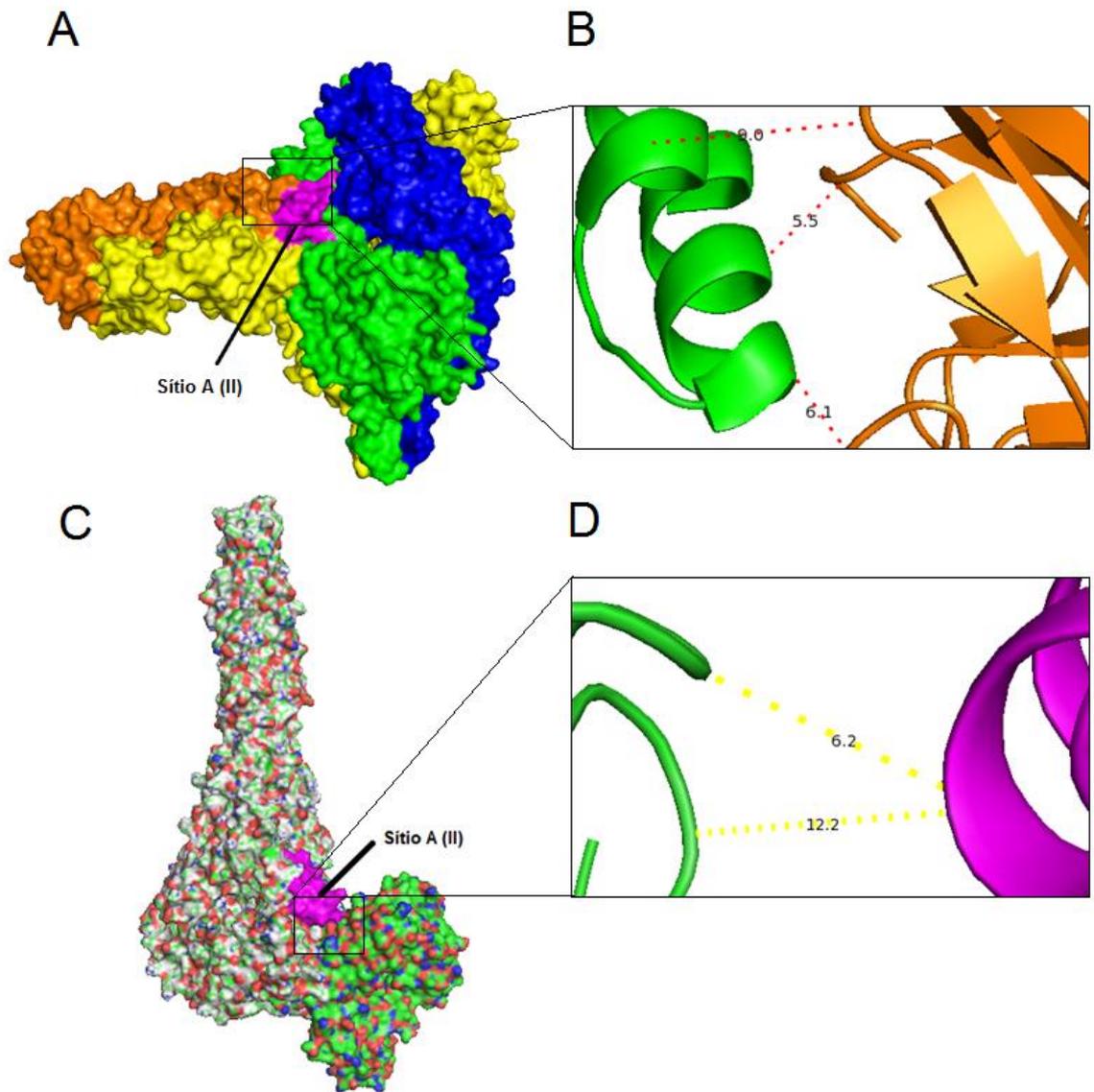


FIGURA 10

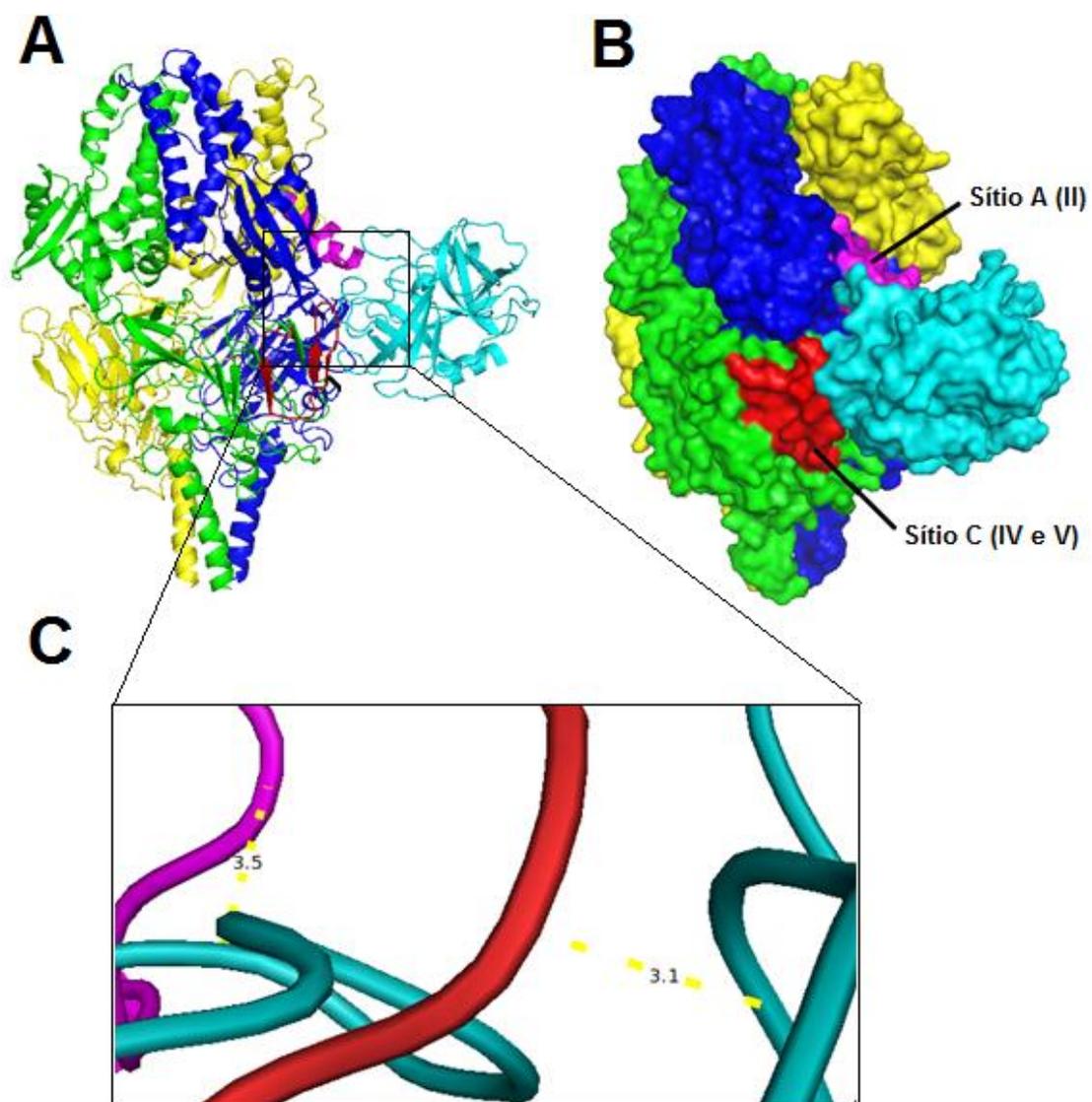


FIGURA 11

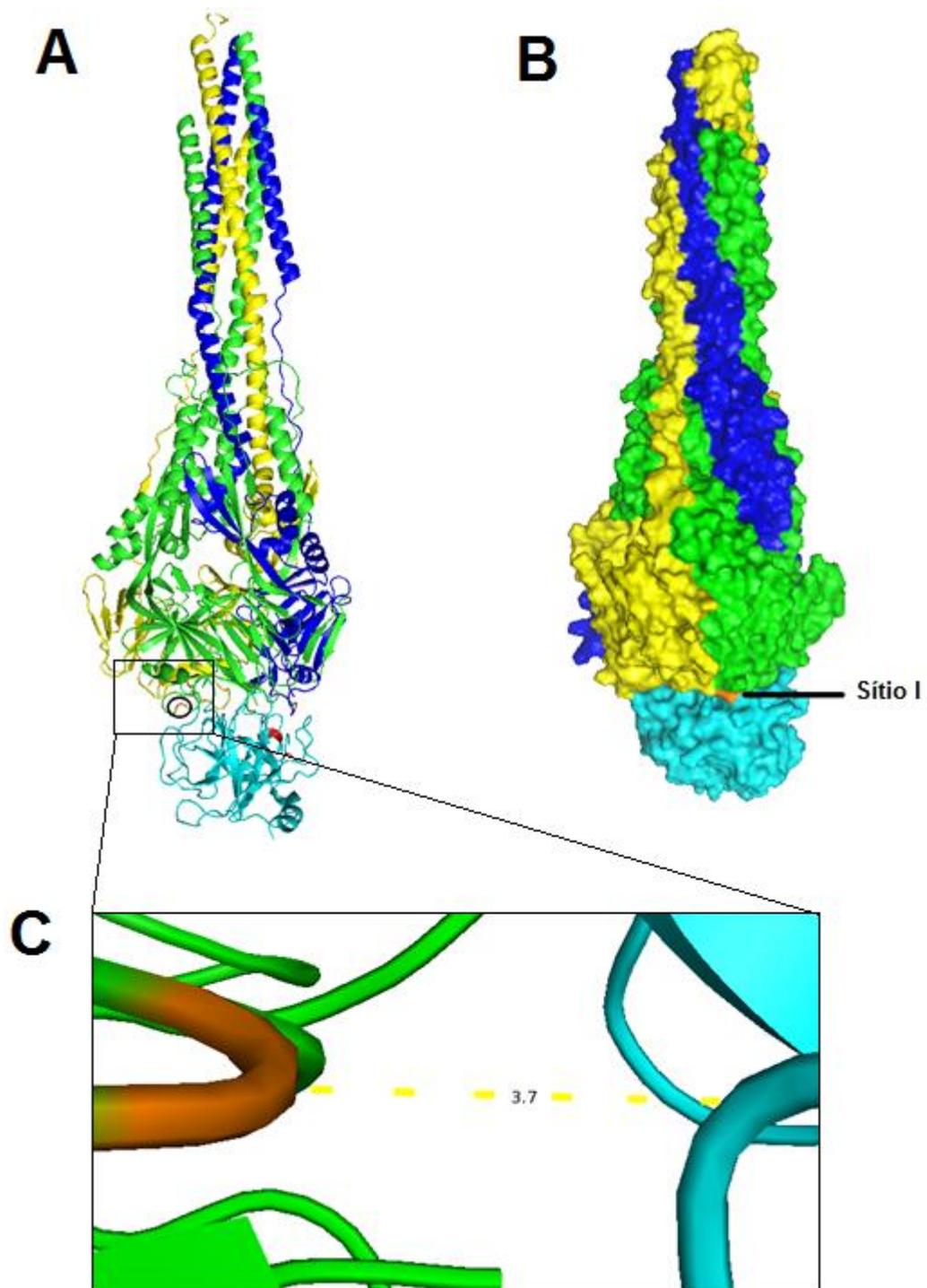


FIGURA 12

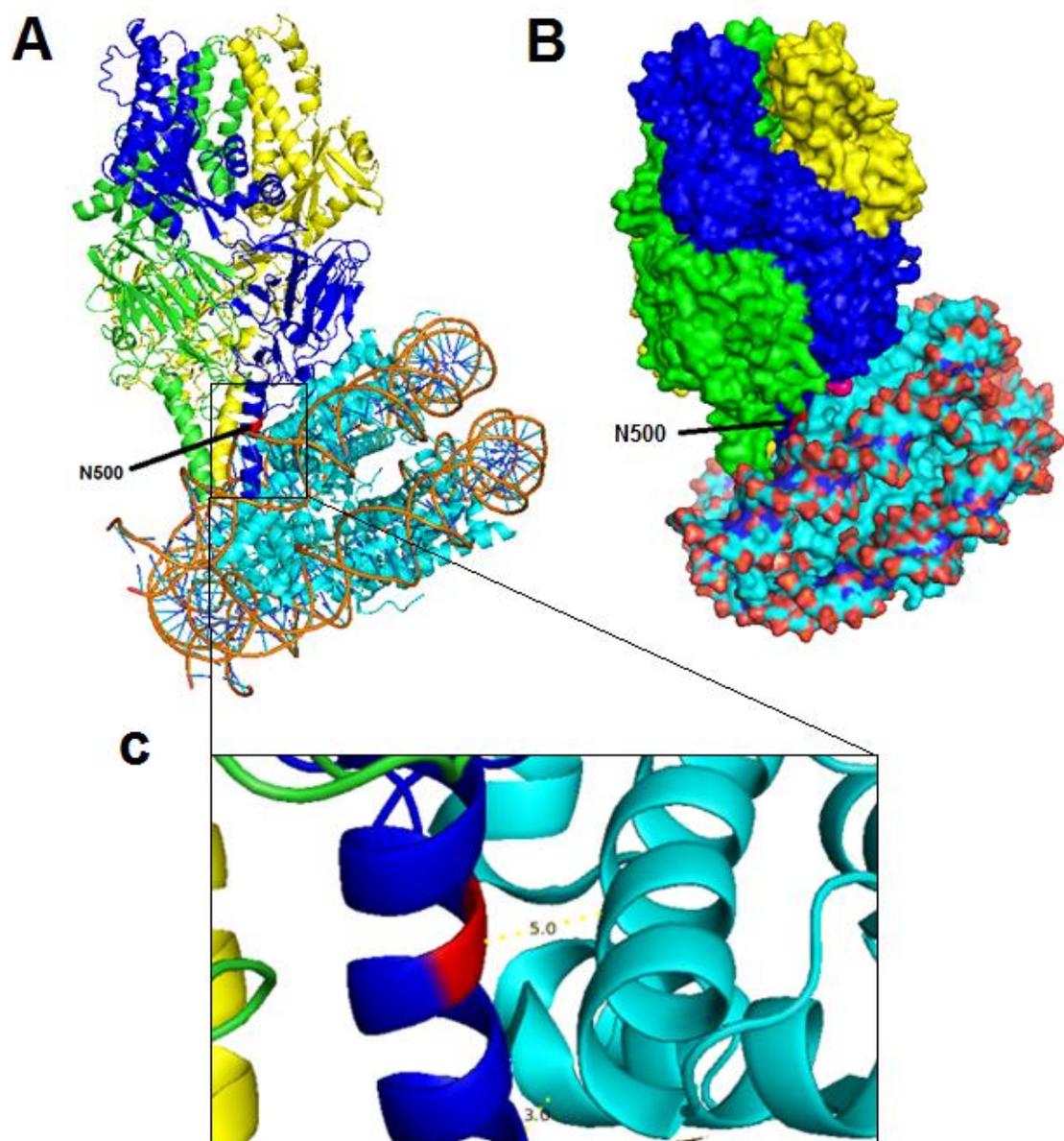
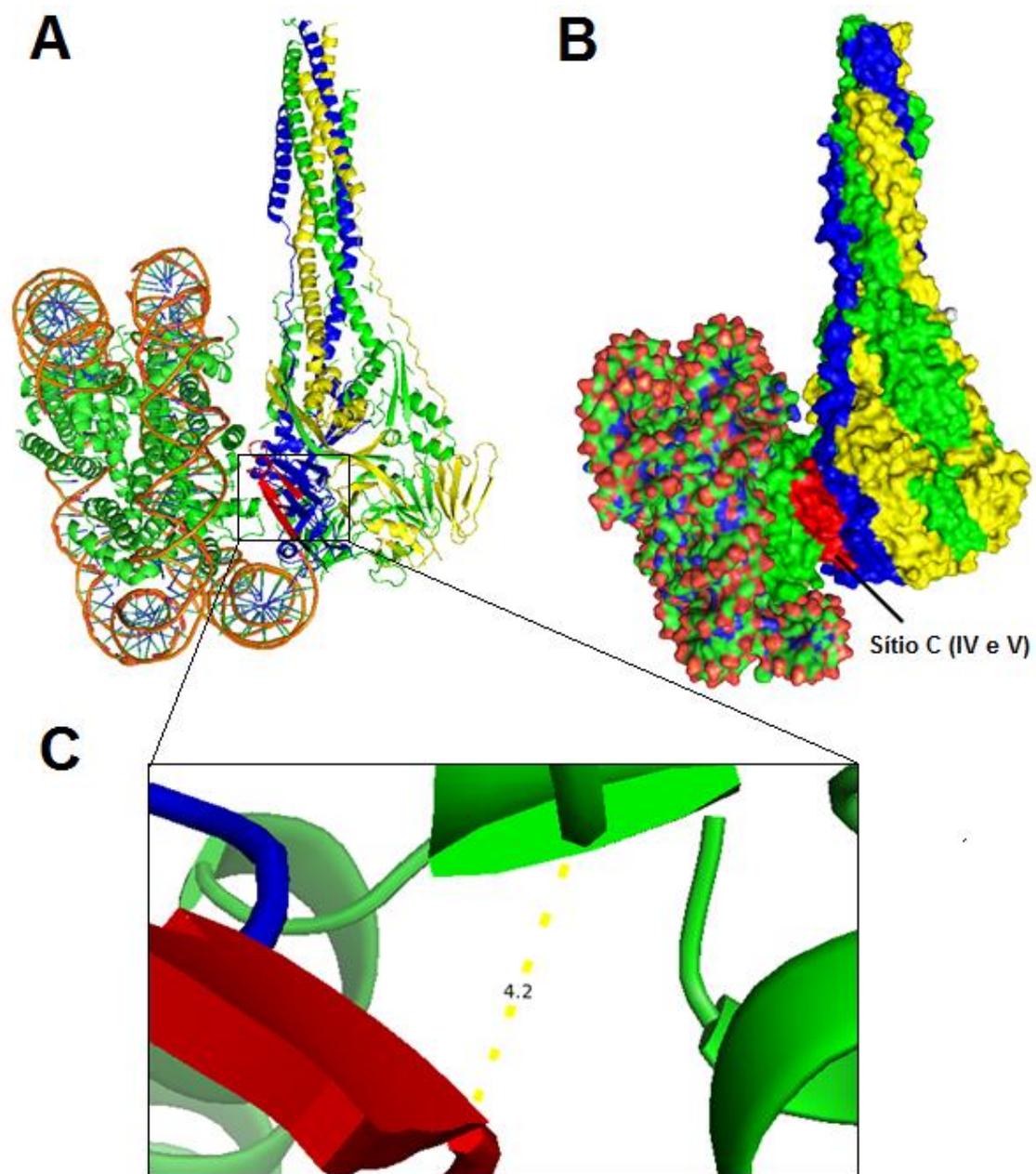


FIGURA 13



## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 03 / 04 / 17

*Priscila S. Sampaio*

---

Assinatura do autor