



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

Ronaldo Silva Alves Junior

**Interação e atividade das NETs sobre o Vírus Sincicial Respiratório
Humano (hRSV) em modelo *in vitro***

São José do Rio Preto
2023

Ronaldo Silva Alves Junior

Interação e atividade das NETs sobre o Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) em modelo *in vitro*

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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES e FAPESP

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Alves de Toledo

São José do Rio Preto
2023

A474i Alves Junior, Ronaldo Silva

Interação e atividade das NETs sobre o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) em modelo in vitro / Ronaldo Silva Alves Junior. -- São José do Rio Preto, 2023

72 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Karina Alves de Toledo

1. hRSV. 2. NETs. 3. Imunidade Inata. 4. Antivirais. 5. Proteases. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Ronaldo Silva Alves Junior

**Interação e atividade das NETs sobre o Vírus Sincicial Respiratório
Humano (hRSV) em modelo *in vitro***

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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES e FAPESP

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Karina Alves de Toledo
UNESP – Câmpus de Assis
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Barbara Nery Porto, Universidade de Manitoba, Canadá

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

Data da defesa: 04/10/2023

São José do Rio Preto
2023

Dedico esta tese à

Minha família, minha orientadora e aos colegas de trabalho pela força e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha orientadora, que sempre esteve disposta a me ajudar, incentivando o desenvolvimento do projeto e comemorando a cada conquista.

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

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 – Processo: 88887.649399/2021-00; Projeto Regular FAPESP Processo 2018/09021-4.

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório (hRSV) é o principal agente etiológico das infecções virais agudas do trato respiratório inferior, resultando em mais de 3 milhões de casos muito graves de bronquiolite todo o ano. Durante a infecção, os neutrófilos são massivamente recrutados ao local infeccioso, onde são estimulados a liberarem as NETs. Estas estruturas são compostas por DNA complexado a diferentes proteínas e enzimas. O hRSV é capaz de induzir a formação das NETs através da sua proteína F. Embora ainda não esteja claro qual seria o ligante das NETs para o RSV, estas estruturas apresentam ação virucida sobre o referido microrganismo. Neste trabalho, procuramos identificar um ligante das NETs para o hRSV, bem como, expandir o entendimento do impacto de diferentes proteases no curso da infecção *in vitro* para isolados clínicos e laboratoriais. Ensaio de *Western blotting* e imunoprecipitação apontaram interação do hRSV com uma banda de 50-75kDa presente nas NETs, identificada como mieloperoxidase (MPO) através de análises de sequenciamento de peptídeos e *Western blotting*. MPO purificada foi capaz de interagir com hRSV e o inibidor enzimático de MPO (PF-06281355) foi capaz de inibir sua ação virucida frente a isolados laboratoriais e clínicos do vírus. À exemplo de MPO, a atividade virucida de elastase e catepsina-G, bem como das NETs, foi estendida aos isolados clínicos. Os inibidores enzimáticos de todas as enzimas citadas acima bloquearam a ação virucida das enzimas e das NETs. Estes resultados, em conjunto com aqueles previamente descritos na literatura, demonstram que o efeito virucida das NETs se aplica a isolados laboratoriais e clínicos do hRSV, e que os mecanismos moleculares desta atividade envolvem a interação de hRSV com MPO, bem como a ação enzimática dela e de outras enzimas como elastase e catepsina G. O avanço dos estudos sobre a interação das NETs com o hRSV contribui para o entendimento dos efeitos benéficos ou deletérios das NETs no curso da infecção, possibilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias que visem o bem estar e a qualidade de vida do paciente infectado.

Palavras-chave: hRSV. NETs. Imunidade Inata. Antivirais. Proteases.

ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the primary etiological agent of acute viral infections in the lower respiratory tract, resulting in over 3 million severe cases of bronchiolitis every year. During infection, neutrophils are massively recruited to the infectious site, where they are stimulated to release NETs. These structures are composed of DNA complexed with various proteins and enzymes. hRSV can induce the formation of NETs through its F protein. Although it is not yet clear what the NETs' ligand for RSV would be, these structures exhibit virucidal action against the mentioned microorganism. In this study, we sought to identify a ligand for NETs in hRSV, as well as expand the understanding of the impact of different proteases during in vitro infection for clinical and laboratory isolates. Western blotting and immunoprecipitation assays indicated an interaction between hRSV and a 50-75kDa band present in NETs, identified as myeloperoxidase (MPO) through peptide sequencing and Western blotting analyses. Purified MPO was able to interact with hRSV, and the enzymatic inhibitor of MPO (PF-06281355) was able to inhibit its virucidal action against laboratory and clinical isolates of the virus. Similar to MPO, the virucidal activity of elastase and cathepsin-G, as well as NETs, was extended to clinical isolates. Enzymatic inhibitors of all the mentioned enzymes above blocked the virucidal action of the enzymes and NETs. These results, in conjunction with those previously described in the literature, demonstrate that the virucidal effect of NETs applies to both laboratory and clinical isolates of hRSV, and the molecular mechanisms of this activity involve the interaction of hRSV with MPO, as well as its enzymatic action and that of other enzymes like elastase and cathepsin G. Advancing studies on the interaction of NETs with hRSV contributes to the understanding of the beneficial or deleterious effects of NETs during infection, thus enabling the development of new strategies aimed at the well-being and quality of life of infected patients.

Keywords: hRSV. NETs. Innate Immunity. Antivirals. Proteases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Proteínas estruturais e não estruturais do hRSV	17
Figura 2 – Mecanismos de geração de NETs	23
Figura 3 – Perfil eletroforético das NETs	38
Figura 4 – Interação das NETs com hRSV	41
Figura 5 – Interação entre MPO e hRSV	44
Figura 6 – Metabolização do sal de tetrazólio em formazana	45
Figura 7 – O inibidor de MPO (PF-06281355) não interfere na viabilidade celular e na infectividade do hRSV	47
Figura 8 – Ação de MPO e inibição desta utilizando PF-06281355	48
Figura 9 – Inibição do efeito das NETs	50
Figura 10 - Inibidores de catepsina-G e elastase não interferem na viabilidade celular e na infectividade do hRSV	52
Figura 11 - Atividade anti-hRSV	54
Figura 12 - Redução da ação virucida das NETs	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do sequenciamento correspondente à banda de 50-75kDa	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE 2 Enzima conversora de angiotensina 2

ARI Infecções respiratórias agudas

CCL Quimiocina

CXCL Quimiocina

CX3CR1 Receptor 1 de quimiocina

CHIKV Febre Chikungunya

DNA Ácido desoxirribonucleico

FDA Food and drug administration

FeLV Vírus da leukemia felina

HEp-2 Células de carcinoma oro faríngeo

HIV-1 Vírus da imunodeficiência humana, tipo 1

hRSV Vírus sincicial respiratório humano

MPO Mieloperoxidase

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NETs Redes extracelulares de neutrófilos

NF- κ B Fator nuclear kappa B

OMS Organização mundial da saúde

PAMPs Padrão molecular associado ao patógeno

PRRs Receptores de reconhecimento padrão

PSGL-1 Contra-receptor de alta afinidade para a P-selectina

PMA Phorbol 12-myristate 13-acetate

RIG-1 Receptor de reconhecimento de padrão citosólico

IL Interleucina

RNA Ácido desoxirribonucleico

ROS Espécies reativas de oxigênio

SNC Sistema nervoso central

ICAM Molécula de adesão intercelular

IFN-1 Interferon do tipo 1

TLR Toll like receptor

RNP Complexo ribonucleoproteico

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	Kilodalton
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)	13
1.1.1. Epidemiologia e Patologia	13
1.1.2. Estrutura e genoma	15
1.1.3. Profilaxia e tratamento	18
1.2. Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)	19
1.2.1. Imunidade inata e o hRSV	19
1.2.2. Os neutrófilos na infecção por hRSV	21
1.2.3. Geração de NETs e o hRSV	24
1.2.4. Enzimas granulares	25
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Declaração de ética	29
3.2. Materiais	29
3.2.1. Reagentes	29
3.2.2. Cultura celular	29
3.2.3. Estoque viral	30
3.3. Métodos	30
3.3.1. Isolamento de neutrófilos	30
3.3.2. Geração de NETs	31
3.3.3. Quantificação e caracterização das NETs	31
3.3.4. Identificação de ligantes das NETs para o hRSV	32
3.3.5. Sequenciamento de peptídeos	33
3.3.6. Avaliação da identidade de MPO e de sua interação com o hRSV	34
3.3.7. Avaliação da atividade antiviral das NETs, MPO, elastase e catepsina-G	35
3.3.8. Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1. Caracterização das NETs produzidas	37
4.2. Identificação de ligantes das NETs para o hRSV	38
4.3. Elastase e Catepsina-G também atuam em isolados clínicos de hRSV	50
5. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)

1.1.1. Epidemiologia e Patologia

As infecções respiratórias agudas (ARI), são as principais patologias que acometem pessoas de todos os continentes. Em especial, as infecções virais do trato respiratório superior e/ou inferior, têm sido um problema persistente de saúde pública mundial (FIGUEIREDO, 2009).

O hRSV, é um dos principais agentes etiológicos dentre as infecções respiratórias (MIZGERD *et al.*, 2008). Em casos mais severos, o agravamento do quadro devido à pneumonia e/ou bronquiolite aguda, pode levar o paciente a óbito. Possui alta taxa de morbitalidade em grupos suscetíveis sendo estes, idosos, imunocomprometidos e, principalmente, crianças. (JHA, AKHILESH, *et al.*, 2016; CLARK *et al.*, 1978).

Ao redor de todo o planeta, estima-se que a incidência da infecção por hRSV é de 33 milhões de novos casos ao ano em crianças de até 5 anos de idade. De todas elas, 10% necessitam de internação hospitalar, destas, 199,000 mil casos acabam em morte (JHA, AKHILESH, *et al.*, 2016). Dados apontam que o vírus sincicial respiratório, acomete 70% de todas elas antes do sexto ano de idade, aos 2 anos quase todas as crianças podem ter contraído a infecção ao menos uma vez (FALSEY *et al.*, 2005; CANE, 2001).

Crianças nascidas prematuras, com doença pulmonar crônica ou cardiopatias, apresentam maior vulnerabilidade à infecção, resultando em aumento da mortalidade (AUJARD *et al.*, 2012; BOYCE *et al.*, 2000). Países que estão em desenvolvimento, apresentam maior incidência do vírus e devido a falta de recursos clínicos, a taxa de mortalidade torna-se maior (NAIR H. *et al.*, 2010).

Em adultos, a incidência do hRSV é semelhante ao vírus influenza não pandêmico (FALSEY *et al.*, 2000). Estudos sugerem que o risco de casos mais graves aumenta entre os mais vulneráveis: cardiopatas, imunocomprometidos e idosos (CHEMALY *et al.*, 2006; ENGLUND *et al.*, 1988; FALSEY *et al.*, 2005)

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV), é datado desde o ano de 1956, como sendo a primeira vez em que uma amostra foi isolada através de um

chimpanzé, pois o animal apresentava sintomas respiratórios. Porém, o vírus foi nomeado somente na década de 60 (MORRIS *et al.*, 1956).

A memória imunológica para o hRSV é incompleta, sem a memória permanente, é natural que haja reinfecções em uma mesma pessoa ao longo de toda vida (CHANOCK *et al.*, 1961; FALSEY *et al.*, 2005). As altas taxas de infecção são cíclicas, tal fato ocorre devido à sazonalidade. Em países temperados, o pico da doença está relacionado às estações com temperaturas mais frias, outono, inverno e início de primavera (JANET *et al.*, 1998). Enquanto que nos trópicos, a amplitude da patologia ocorre em períodos chuvosos (WEBER *et al.*, 1998).

O processo infeccioso pode ser iniciado por meio do contato direto com partículas virais, que podem estar dispersas em aerossóis e/ou superfícies contaminadas, inoculando o nariz, olhos e/ou boca do indivíduo (JENSEN *et al.*, 1994). Estudos sugerem que a partícula viral pode permanecer viável em tempos que variam de 20 minutos chegando até 6 horas, em superfícies como roupas e pele, dessa forma a propagação do vírus é viabilizada (WRIGHT *et al.*, 2011; HALL *et al.*, 1983).

A infecção causada por hRSV, pode levar ao desenvolvimento de sintomas como: tosse, dificuldade respiratória, dificuldade de alimentação, hipoxemia e sibilos (MIZUTA *et al.*, 2013). Estudos pontuais mostraram que componentes proteicos e RNA do vírus foram detectados no SNC de indivíduos infectados, portanto sugere-se que possa haver relação com neuropatologias, tais como: convulsões, encefalopatias e esotropia (BOHMWALD *et al.*, 2018; ESPINOZA *et al.*, 2013; SWEETMAN *et al.*, 2005).

Segundo a OMS, o alto risco para lactentes e crianças torna-se uma preocupação mundial, pois mesmo com estudos voltados para o desenvolvimento de estratégias para conter o vírus, ainda não se tem uma vacina autorizada. A única profilaxia eficaz, porém, de alto custo e difícil acesso, é realizado através da administração de um anticorpo monoclonal específico para o vírus, o Palivizumabe.

1.1.2. Estrutura e genoma

O hRSV pertence à família *Paramyxoviridae* do gênero *Pneumovirus*, conhecido como vírus sincicial respiratório humano. Normalmente se apresentam na forma esférica, com bicamada lipídica herdada da célula alvo do hospedeiro, através

de brotamento no processo de replicação viral. Formas filamentosas podem ser encontradas, da mesma maneira que vírions esféricos, estes também são infecciosos. Quanto ao tamanho, podem variar de 120nm a 350nm, caracterizado por ser envelopado, com nucleocapsídeo helicoidal, RNA genômico, fita simples não segmentada de sentido negativo. Seu genoma tem aproximadamente 15,2kb distribuídos em 10 genes que codificam 11 proteínas devido a fase de leitura aberta no gene M2 (BORCHERS *et al.*, 2013).

As proteínas virais podem ser classificadas em estruturais, quando constituem alguma estrutura da partícula viral infectante, denominada vírion, ou não estruturais, quando não podem ser observadas na estrutura no vírion, estas são traduzidas durante o processo de replicação viral (OJWANG *et al.*, 2005).

NS1 e NS2 são proteínas não estruturais, localizadas próximo à região 3' do genoma viral, são de tamanho reduzido, expressas em grandes quantidades por células infectadas (PEI *et al.*, 2021). Além de auxiliarem durante o processo de transcrição dos genes, apresentam ação de supressão à produção de interferon do tipo-1 (IFN-1), visando moléculas envolvidas na cascata de sinalização, de maneira modulatória, levando ao amortecimento da resposta imune inata do hospedeiro (SEDEYN *et al.*, 2019; THORNHILL *et al.*, 2020).

A nucleoproteína N, envolvida na formação do capsômero, é a primeira proteína estrutural a ser transcrita (GARCIA *et al.*, 1993). O RNA viral está envolvido pelo capsômero, formando o nucleocapsídeo helicoidal. Tal estrutura possibilita maior resistência impedindo que o RNA viral seja degradado (RINCHEVAL *et al.*, 2013). Estudos sugerem que o nucleocapsídeo possa dificultar ou até mesmo impedir o reconhecimento do RNA por receptores TLRs, impactando na resposta imune inata do hospedeiro (BAKKER *et al.*, 2013; TAWAR *et al.*, 2009).

Durante a síntese de RNA, a fosfoproteína P atua como cofator interagindo com as proteínas N e L. Através disso, forma-se o complexo ribonucleoproteico (RNP), atuando no processo de encapsulamento do genoma viral, apresentado na figura 1 (COLLINS *et al.*, 2008).

Quanto à proteína L se apresenta como sendo a principal subunidade da polimerase. Com relação ao seu papel, atua como uma RNA polimerase mediando a formação do capsídeo e, agindo na poliadenilação (MENGJIE HU *et al.*, 2020).

Durante a síntese do RNA, a fosfoproteína P apresenta papel essencial, funcionando de forma similar à chaperona, mediando proteínas virais a alcançarem

conformação de maneira correta. Além disso, o aumento da especificidade de encapsulamento do RNA viral, impede que a proteína M se ligue aos RNAs celulares.

A proteína de matriz M, caracterizada por ser estrutural, se encontra localizada abaixo da bicamada lipídica, ao redor do nucleocapsídeo formando uma camada de matriz (GHILDYAL *et al.*, 2006). Nas primeiras horas pós-infecção, a proteína M é translocada para o núcleo, resultando na inibição da transcrição do genoma da célula hospedeira, priorizando a transcrição de genes virais (LI *et al.*, 2021). Além disso, estudos recentes de cristalografia, mostram que o processo de montagem e brotamento de partículas virais, é viabilizado por meio da dimerização e oligomerização desta proteína (BATTISTI *et al.*, 2012; FOSTER *et al.*, 2015).

M2-1 e M2-2 são essenciais aos processos de transcrição e replicação do RNA, além disso, durante a montagem de novos vírions, a proteína M2-2 atua em conjunto com NS1 e NS2. No interior do envelope as proteínas M2-1 e M2-2 ficam dispersas, enquanto que as proteínas N, P e L associam-se ao RNA originando o complexo ribonucleoproteico (RNP), como apresentado na figura 1 (BAKKER *et al.*, 2013; TAWAR *et al.*, 2009; TIWARI *et al.*, 2014).

As glicoproteínas transmembrana (SH, G, F) são ligadas ao envelope viral e se estendem através da bicamada lipídica formando picos superficiais de 8 a 12nm (TIWARI *et al.*, 2014). A proteína G, é uma proteína de membrana do tipo II, está associada a mediação da ligação do vírion às células do hospedeiro (MENGJIE HU *et al.*, 2020). Estas proteínas tem afinidade por células epiteliais ciliadas do trato respiratório humano, interagindo através de receptores CX3CR1, TLR-4 e heparina sulfatada, iniciando a etapa de internalização. Muitos trabalhos sugerem que, a glicoproteína G possa estar relacionada com o escape do vírus à imunidade inata do hospedeiro (ARNOLD *et al.*, 2004; POLACK *et al.*, 2005; SHINGAI *et al.*, 2008; KONIG *et al.*, 1996).

O hRSV apresenta apenas um sorotipo subdividido em dois principais grupos antigênicos, A e B. Ambas as cepas destes grupos são contagiosas e circulantes, porém de forma recorrente, apenas uma se torna predominante (MENGJIE HU *et al.*, 2020). A glicoproteína G é pouco conservada dentre os subtipos de hRSV, o que possibilita sua utilização para a classificação do grupo antigênico (SHINGAI *et al.*, 2008; J. WALSH *et al.*, 1983).

Com tamanho pequeno, a proteína SH é classificada como transmembrana do tipo II, atuando na formação de canais iônicos, como uma viroporina (ARAÚJO *et al.*, 2016). Trabalhos pontuais sugerem potencial atividade imunomoduladora para SH, no entanto, faltam estudos que completem o esclarecimento quanto ao seu papel durante o ciclo replicativo do vírus (GAN *et al.*, 2012).

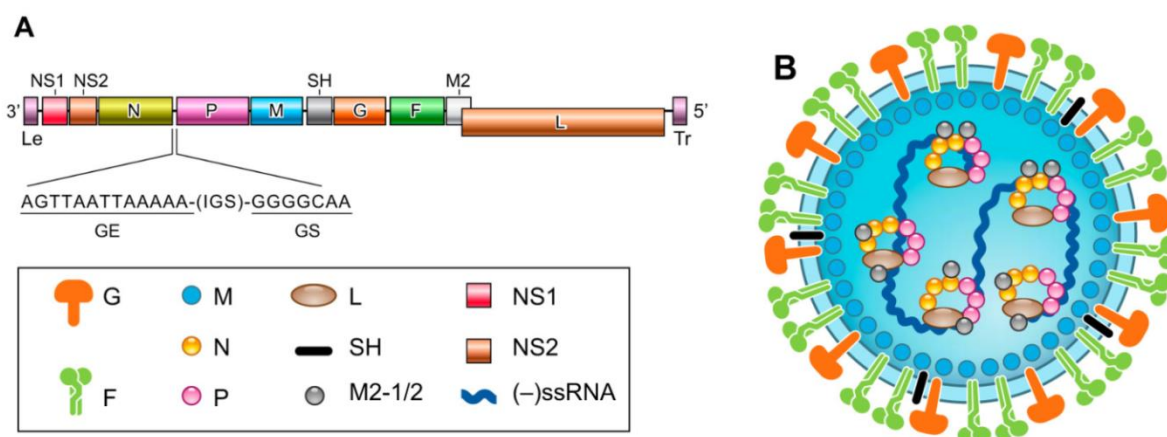


Figura 1. Proteínas estruturais e não estruturais do hRSV. A) Representação esquemática do processo de tradução de proteínas do hRSV a partir de genes na fase de leitura. B) Em verde, laranja e preto as proteínas transmembrana responsáveis pelas etapas iniciais de infecção (SH, G e F). O complexo ribonucleoproteico (RNP) é responsável pelo armazenamento e transcrição inicial do genoma (N, P e L). O envelope é formado pela proteína M e as proteínas M2-1 e M2-2 auxiliam no controle do ciclo infeccioso. Fonte: Adaptado de MENGJIE HU *et al.*, 2020.

A proteína F, uma glicoproteína do tipo I, apresenta estrutura relativamente conservada entre os *Pneumovirus* o que a torna um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e drogas antivirais (MELERO, JOSÉ *et al.*, 2015; MODJARRAD *et al.*, 2016). Sua função é essencial quanto à infecção, pois ela realiza a fusão do envelope viral com a membrana da célula alvo, internalizando o nucleocapsídeo no citosol celular (COLLINS, 1993). Além disso, a característica morfológica do hRSV é fazer com que células vizinhas se fundam umas às outras, formando grandes células multinucleadas denominadas de sincícios, processo no qual é mediado através da proteína F (GONZÁLEZ-REYES *et al.*, 2001). Inicialmente sintetizada como um precursor (F0) de aproximadamente 72 kDa que, para tornar-se competente à fusão, deve passar por processo de clivagem através de proteases semelhantes à furina, originando duas subunidades F1 (~50 kDa), F2 (~15 kDa) e o

peptídeo solúvel p27, que se apresentam ligados de forma covalente por meio de pontes de dissulfeto (GONZÁLEZ-REYES *et al.*, 2001; ZIMMER *et al.*, 2001).

A junção de três estruturas monoméricas idênticas origina uma proteína trimérica. Uma vez clivado, o trímero é totalmente ativado e expresso na superfície de células infectadas, bem como em vírions. Assim, a proteína F se faz necessária em três formas conformacionais: pré-fusão, intermediária e pós-fusão (SWANSON *et al.*, 2011; MCLELLAN *et al.*, 2011; MCLELLAN *et al.*, 2013)

No estado de pré-fusão, caracterizado por ser estável, o trímero se encontra na superfície de vírions e células infectadas. Conforme a proteína (F) interage com receptores celulares de células alvo do hospedeiro, esta sofre modificações conformacionais, os peptídeos da região N-terminal de (F) são inseridos na membrana citoplasmática da célula alvo, caracterizando o estado intermediário, pre-hairpin (BEGONA RUIZ-ARGUELLO *et al.*, 2002; MCLELLAN *et al.*, 2013). Ao final deste processo, há junção da membrana citoplasmática com o envelope viral, o trímero se apresenta como uma estrutura muito estável, correspondente ao estado de pós-fusão. Para que aconteça fusão do vírus à célula alvo, necessita-se de várias moléculas de proteína (F) envolvidas durante o processo (MELERO JOSÉ *et al.*, 2015).

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 vivo* e *in vitro* (BENNETT BL *et al.*, 2007; KARRON *et al.*, 1997).

1.1.3. Profilaxia e tratamento

Não existe tratamento específico para a doença causada pelo hRSV. Frente à infecção aguda necessita-se de hospitalização, algumas medidas de suporte são utilizadas para o alívio dos sintomas. Quanto ao uso de broncodilatadores, é relatado como uma prática comum, porém sem apresentar resultado positivo ao desfecho da patologia (LIEBERTHAL *et al.*, 2006).

A ribavirina é um agente antiviral de amplo espectro, análogo de nucleosídeo, aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*), utilizada para lactentes e crianças com bronquiolite aguda (VENTRE AND RANDOLPH, 2007). Alguns estudos indicam que o tratamento com esta droga seja eficaz no início da infecção, resultando na diminuição do tempo de hospitalização e suporte de ventilação, porém

estes estudos ainda são inconclusivos, visto que a eficácia deste tratamento depende do diagnóstico precoce da infecção, o que geralmente não é possível devido à similaridade sintomática com outras infecções e, devido ao risco mutagênico para o paciente causado pela ribavirina (HAN *et al.*, 1990; MEJÍAS AND RAMILO, 2008; WELLIVER, 2003).

A medida profilática atual recomendada pelo órgão competente consiste na administração de Palivizumab, um anticorpo monoclonal que tem como alvo a proteína F do hRSV. Estudos demonstraram que a partir da profilaxia utilizando este anticorpo, houve redução significativa de hospitalizações de crianças e lactentes. Durante o período antecedente à circulação do vírus, recomenda-se a aplicação de doses mensais necessárias. Portanto, devido ao custo elevado, a profilaxia com Palivizumabe torna-se inacessível, principalmente em países em desenvolvimento como no Brasil (FELTES *et al.*, 2003; ZAAIJER *et al.*, 2002).

1.2. Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

1.2.1. Imunidade Inata e o hRSV

Durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório humano (hRSV), as células epiteliais que revestem o trato respiratório tornam-se alvos primários para o vírus, desencadeando assim o processo infeccioso. Essas células são responsáveis por expressar uma ampla gama de mediadores inflamatórios, que incluem diversas classes de citocinas e quimiocinas, tais como CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CXCL10, CXCL11, IL-8 e IL-15. Além disso, elas também apresentam a expressão de receptores do tipo Toll Like Receptor, como o TLR-3, e a proteína quinase R, o que, por sua vez, induz a ativação de uma resposta imune inata e antiviral (BECKER *et al.*, 1991; MAYER *et al.*, 2007; OGRA, 2004).

Os receptores de reconhecimento padrão (PRR) interagem com padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), com a finalidade de reconhecer a infecção por hRSV, que, na maioria das vezes ocorre por meio de RNAs virais produzidos durante a replicação. Os PRR de células epiteliais envolvidos na infecção viral, são os receptores do tipo RIG-1 e Toll Like Receptor (TLR), que são capazes de ativar fatores de transcrição como NF- κ B e fatores de regulação do interferon 1 e

7(IFN 1/7). Tais fatores desencadeiam a ativação de interferon do tipo 1 (IFN-1), citocinas e quimiocinas (TULIC *et al.*, 2007; HAEBERLE *et al.*, 2002).

Durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório humano (hRSV), um complexo mecanismo envolvendo células do sistema imune inato e adaptativo é desencadeado, com a participação ativa de diversos tipos celulares, tais como monócitos, eosinófilos, células T de memória e neutrófilos, que são recrutados para o local da infecção com o propósito de conter a disseminação do hRSV (MENGJIE HU *et al.*, 2020). Estudos científicos têm evidenciado um aumento na expressão de integrinas, como a ICAM-1, por células epiteliais infectadas durante a infecção, o que promove a adesão celular e resulta na acumulação significativa de neutrófilos nos tecidos infectados (RUDD *et al.*, 2007; KURT-JONES *et al.*, 2000).

Em lactentes que desenvolvem bronquiolite, observa-se um marcante aumento no influxo de neutrófilos tanto nas vias aéreas superiores quanto nas inferiores. Adicionalmente, produtos derivados destes leucócitos, como a mieloperoxidase e a elastase, podem ser detectados em níveis elevados nestes locais afetados (SMITH, *et al.*, 2001). Esses achados refletem a complexa resposta inflamatória que ocorre durante a infecção por hRSV e destacam a importância dos neutrófilos e de outras células do sistema imune na tentativa de combater a infecção e mitigar seus efeitos nos tecidos respiratórios (SMITH, *et al.*, 2001).

1.2.2. Os neutrófilos na infecção por hRSV

Os neutrófilos constituem a classe de leucócitos polimorfonucleares, são as células mais abundantes circulantes no sangue, constituindo a primeira linha de defesa do sistema imune inato, durante a infecção por hRSV são os primeiros a chegarem no local infeccioso (AMULIC *et al.*, 2012). A diminuição significativa destes leucócitos no sangue pode implicar em consequências graves, à exemplo, denominada imunodeficiência grave em humanos (BRINKMANN *et al.*, 2004; LEY *et al.*, 2007; MANTOVANI *et al.*, 2011; PHILLIPSON *et al.*, 2011; SADIK *et al.*, 2011; SOEHNLEIN AND LINDBOM, 2010; DOTTA *et al.*, 2011; ZEIDLER *et al.*, 2009).

Estas células apresentam tempo de meia vida relativamente curto, com duração de aproximadamente 8-24 horas de vida em circulação (GALLI *et al.*, 2011; PILLAY *et al.*, 2010). Além do sangue, se encontram presentes em órgãos como o baço, fígado, pulmão e, medula óssea, este último corresponde ao reservatório de

maturação de neutrófilos, produzidos dentro de cordões hematopoiéticos nos seios venosos da medula óssea. A população destes leucócitos no órgão de maturação é dividida de três formas: células tronco, mitóticos e pós-mitóticos. O último estágio corresponde aos neutrófilos completamente diferenciados e maduros. O processo de liberação destas células ocorre de forma coordenada mediante gradiente quimiotático. Vale ressaltar que durante infecções e algumas patologias, a quantidade de neutrófilos circulantes aumenta. Estudos sugerem que a produção destes leucócitos seja de 10×10^{10} células/dia (PETERS, 1998; SUMMERS *et al.*, 2010).

Os neutrófilos apresentam diversos mecanismos de defesa, com potente ação microbicida contra microrganismos oportunos, efeitos estes que podem ser deletérios até mesmo para células do hospedeiro (PANG AND IWASAKI, 2011). No ambiente inflamatório, o processo de ativação destes leucócitos é cuidadosamente coreografado através de uma cascata de sinalização, mediante aos diferentes estímulos indutores (KOLACZKOWSKA AND KUBES, 2013). Uma vez ativado, seu tempo de vida é prolongado em função dos mediadores secretados, o que garante sua atividade no local da infecção (TOFTS *et al.*, 2011).

Em resposta à infecção causada por hRSV, os mediadores inflamatórios secretados (quimiocinas e citocinas), induzem células endoteliais a expressarem moléculas que promovem adesão (NAUMENKO, *et al.*, 2018; PHILLIPSON AND KUBES, 2011). Através do reconhecimento destes sinais inflamatórios, os neutrófilos iniciam o movimento de “rolamento”, mediado pela expressão de moléculas de selectinas e integrinas em direção ao gradiente quimiotático, resultando em transmigração do lúmen endotelial para o sítio infeccioso (LEY *et al.*, 2007).

O mecanismo efector clássico dos neutrófilos é a fagocitose, os microrganismos engolfados são expostos a diversos peptídeos microbicidas, enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando, na maior parte das vezes, em morte de patógenos (SEGAL *et al.*, 1981). Alguns microrganismos desenvolveram estratégias para sobreviver em um ambiente hostil, dentro destas células inatas (LUONG AND LEE, 2002).

A fagocitose pode culminar em apoptose, neutrófilos apoptóticos apresentam condensação da cromatina, fragmentação do DNA com membrana nuclear intacta, vacuolização do citoplasma, organelas citoplasmáticas íntegras, seguido pela expressão de fosfatidilserinas (JANKOWSKI *et al.*, 2002). Além disso, também

podem sofrer o processo de necrose, caracterizado por apresentar perda da estrutura celular e deterioração da membrana citoplasmática (VAN DEN BERG *et al.*, 2001).

Estas atividades dos neutrófilos são recorrentes, resultando em um looping, durante a infecção por hRSV. O epitélio infectado induz a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, culminando no aumento considerável de neutrófilos e seus produtos no sítio infeccioso, corroborando com a inflamação e agravamento do quadro clínico de pacientes (BROWN *et. al.*, 2015).

1.2.3. Geração de NETs e o hRSV

Além de mecanismos de defesa contra patógenos tradicionalmente conhecidos dos neutrófilos, como a fagocitose, desgranulação, e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), eles ainda podem liberar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (BRINKMANN *et al.*, 2004). São estruturas que apresentam eixo central, formado por DNA neutrofílico cravejado por proteínas nucleares, granulares e citoplasmáticas tais como, mieloperoxidase, histonas, serino proteases (elastase, catepsina G e proteinase 3), entre outras (FUNCHS *et al.*, 2007; URBAN *et al.*, 2009).

Através de diferentes estímulos indutores (IL-8, IL-17, bactérias, fungos, protozoários, plaquetas ativadas e PMA-forbol 12 miristato 13-acetato), os neutrófilos são ativados, dependente de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), processo pelo qual culmina em morte, seguido de liberação das NETs, nomeado mecanismo suicida (SOLLBERGER *et. al.*, 2018). Estudos mostraram que estas células inatas ativados podem produzir NETs, de forma rápida, a partir de outro mecanismo sem produção de ROS, pelo qual permanecem viáveis, denominado mecanismo vital. Ambos os mecanismos de geração de NETs, são diferentes daqueles conhecidos por necrose ou apoptose, uma vez que não depende de caspases, visto que não há similaridades morfológicas com neutrófilos apoptóticos e necróticos (BRANITZKI-HEINEMANN *et al.*, 2016).

Durante a formação de NETs via mecanismo suicida, há modificação coordenada em toda estrutura neutrofílica, condensação da cromatina, perda do envoltório nuclear, conseqüentemente o material se dispersa no citoplasma, seguido

por desintegração da membrana citoplasmática, por fim liberação das NETs (SOLLBERGER *et al.*, 2018).

A geração de NETs por neutrófilos é amplamente caracterizada em estudos voltados a patógenos, em maioria, bactérias ou fungos. Entretanto, com relação aos vírus a pesquisa caminha em direção a elucidar esta interação. Pesquisas demonstraram que os vírus podem induzir a liberação destas armadilhas de neutrófilos, mediante receptores do tipo Toll like receptor (TLR) (FUNCHAL *et al.*, 2015; SAITOH *et al.*, 2012).

De acordo com SAITOH *et al.*, (2012) foi demonstrado que as NETs capturam partículas virais de Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 (HIV-1), inativando e evitando ampla dissipação dos mesmos. A IL-10 produzida em resposta ao HIV-1, suprime a geração de NETs, que, por sua vez, é dependente de ROS, induzida por TLR-7 e TLR-8. Neste contexto, a geração de NETs é um mecanismo de resposta antiviral neutralizada por HIV-1, inativado através de elevadas concentrações de mieloperoxidase e α -defensina (SAITOH *et al.*, 2012). O Vírus da Leucemia Felina (FeLV), também está associado ao mecanismo de geração de NETs no local infectado, neste caso, considerada marcador de progressão da doença pela infecção viral (WARDINI *et al.*, 2010).

Foi demonstrado, a partir de modelos experimentais, que neutrófilos isolados de camundongos, quando incubados com o vírus da CHIKV, foram capazes de gerar NETs dependentes de ROS, através de receptores TLR-7. Portanto, em pacientes infectados, os complexos mieloperoxidase-DNA apresentam correlação aos níveis de NETs e carga viral total. Estes achados sugerem que, as redes de neutrófilos em resposta à infecção por Chikungunya apresentam efeito de captura e neutralização de partículas virais (HIROKI *et al.*, 2020)

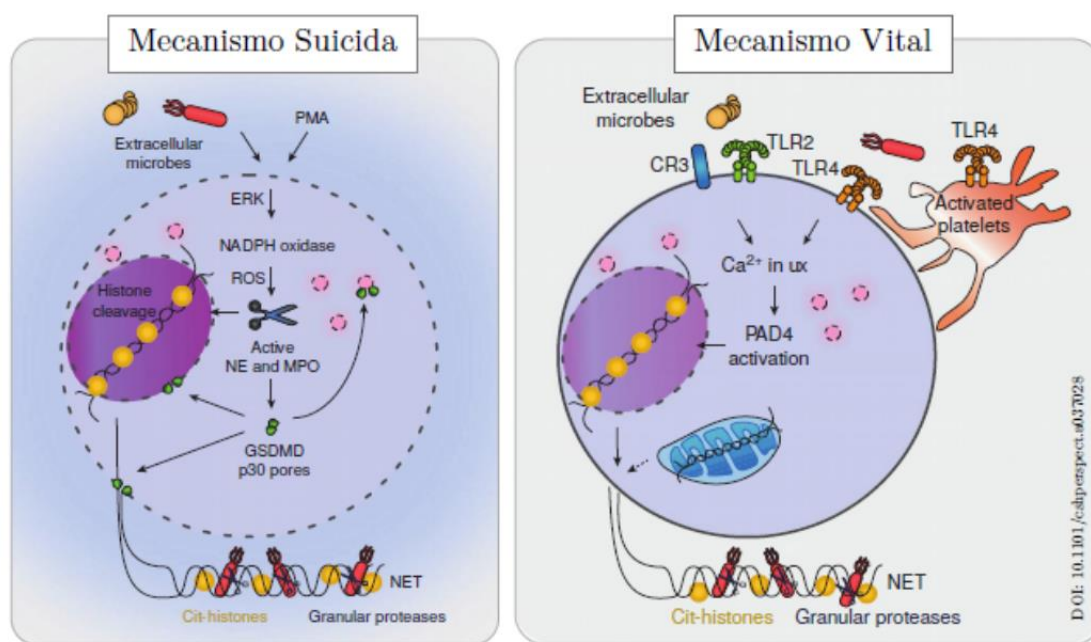


Figura 2. Mecanismos de geração de NETs. Principais mecanismos dos quais há formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, NETs. De acordo com diferentes estímulos indutores há modificações intracelulares que atuam na liberação de parte do conteúdo para o meio extracelular. Fonte: adaptado de LOPES *et al.*, 2022

Os efeitos descritos, com relação à interação das redes de neutrófilos com os vírus apresentados, são, em maioria, benéficos. Uma vez que capturam e/ou neutralizam partículas virais limitando a dissipação da infecção em células alvo. Assim como na infecção por Poxvírus, a liberação de NETs na vasculatura do fígado tem efeito protetor sob células hospedeiras à infecção (JENNE *et al.*, 2013). Porém, estudos apontam que no tecido infeccioso, principalmente em infecções respiratórias, o excesso de neutrófilos e seus produtos, podem causar danos ao hospedeiro (CORTJENS *et al.*, 2016).

Durante a infecção por influenza, os neutrófilos são massivamente recrutados ao sítio infeccioso, os dados gerados mostram que, as NETs produzidas apresentaram efeito na limitação da replicação viral, entretanto outros estudos relataram que o excesso de NETs está relacionadas ao efeito mortal de células epiteliais (NARASARAJU *et al.*, 2011).

Dados recentes voltados à infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2, mostraram que houve liberação de NETs no trato respiratório inferior, em resposta ao novo coronavírus (LEPPKES *et al.*, 2020; VERAS *et al.*, 2020). Entretanto, sugerem que a geração de NETs seja modulada de acordo com a intensidade da

replicação viral, mediante a expressão de receptores ACE 2 em células alvo, porém este mecanismo ainda não está claro (SZTURMOWICZ *et al.*, 2021). Além disso, relataram a possibilidade de correlação da gravidade da doença com o excesso de NETs no tecido infecioso (ACKERMMAN *et al.*, 2021; RADERMECKER *et al.*, 2020; LEPPKES *et al.*, 2020; VERAS *et al.*, 2020).

Neste contexto, pacientes acometidos pela infecção causada por hRSV, neutrófilos e seus produtos foram encontrados no trato respiratório. Estudos demonstraram que, a glicoproteína F do vírus interage com receptores do tipo TLR-4, estimulando a geração de NETs, dependente de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), via NADPH oxidase (FUNCHAL *et al.*, 2015). Além disso, paralelamente, a proteína de fusão pode ativar ERK e p38 MAPK induzindo a liberação de NETs, com DNA cravejado por mieloperoxidase e elastase (FUNCHAL *et al.*, 2015). O excesso de neutrófilos e NETs no local da infecção, está relacionado com aumento da inflamação pulmonar, perda de sua capacidade respiratória com lesão de células epiteliais e endoteliais. (CORTJENS *et al.*, 2016; FUNCHAL *et al.*, 2015).

1.2.4. Enzimas granulares

A produção de NETs, cravejadas com mieloperoxidase e elastase, a partir de neutrófilos estimulados através da glicoproteína F do hRSV, se mostrou dependente de receptores TLR-4 (FUNCHAL *et al.*, 2015). Estudos apontam a importância destas proteínas no processo de liberação destas redes de neutrófilos (METZLER *et al.*, 2011; PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010)

Os neutrófilos são portadores de enzimas e proteínas antimicrobianas previamente sintetizadas, e ao longo do seu processo de maturação, em resposta a estímulos de infecção, ocorre uma transformação dessas biomoléculas em efetores antimicrobianos. Esses efetores são então armazenados em compartimentos intracelulares especializados conhecidos como grânulos, categorizados em quatro classes distintas: vesículas secretoras, grânulos azurofílicos, grânulos específicos e grânulos gelatinase (AMULIC *et al.*, 2012; BORREGAARD, 2010).

À medida que a pesquisa avançou, tornou-se evidente que a atividade microbicida das NETs (Neutrophil Extracellular Traps) está, ao menos em parte, associada às enzimas e proteínas presentes nessas armadilhas liberadas por

neutrófilos. Um exemplo notável é a ação microbicida da mieloperoxidase (MPO), que demonstrou ser eficaz contra o patógeno *S. aureus*, bem como exibiu efeito na eliminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1). Além disso, a elastase presente nas NETs desempenha um papel crucial na inibição do crescimento de *A. fumigatus*, como documentado em estudos anteriores (PARKER *et al.*, 2012; SAITOH *et al.*, 2012).

Além da função descrita microbicida, as enzimas desempenham papéis essenciais aos neutrófilos, como na alteração da expressão de receptores celulares, no mecanismo de liberação das NETs, no neutrófilo apoptótico, na regulação de citocinas e quimiocinas (FUNCHS *et al.*, 2007).

Estudos realizados *in vitro* indicam que, após a ativação dos neutrófilos, mediada pelo sistema de espécies reativas de oxigênio (ROS) via NADPH oxidase, induzida por agentes estimulantes como o PMA ou *Candida albicans*, ocorre um fenômeno conhecido como exPlosão oxidativa, onde a mieloperoxidase (MPO) é ativada e dissociada (WINTERBOURN AND KETTLE, 2013). A elastase também passa pelo processo de ativação e dissociação, sendo influenciada pelo sistema MPO/H₂O₂, o que resulta na degradação da proteína F-actina, permitindo que a serino protease atravesse a membrana nuclear. Simultaneamente, tanto a elastase quanto a MPO contribuem parcialmente para a clivagem das histonas, levando à descondensação da cromatina. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a serino protease é translocada ainda não está completamente elucidado (PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010).

Estes achados sugerem que a MPO seja necessária na liberação de elastase, visto que o processo de descondensação da cromatina, bem como a degradação do citoesqueleto de actina, é dependente de elastase. Estes processos corroboram para a imobilização do neutrófilo, conduzindo a geração de NETs no local da infecção (METZLER *et al.*, 2014; PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010).

Além disso, um complexo formado por enzimas neutrofílicas, das quais estão: proteinase 3, catepsina G, mieloperoxidase e elastase, foi denominado de “azurossoma”. Após ativação do neutrófilo, as proteases descritas são dissociadas através do sistema de exPlosão oxidativa mediada por H₂O₂. Estudos propõe que estas e/ou mais proteases do complexo, estariam envolvidas no processo de liberação de NETs, ainda que este mecanismo não seja totalmente evidenciado (METZLER *et al.*, 2014).

Um estudo, *in vitro*, publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa, mostrou que as NETs podem interagir com partículas virais do hRSV. Este efeito virucida, pode ser comprovado por meio de proteinases capazes de clivar a proteína de fusão do vírus, comprometendo sua ação infectante. Esta atividade foi demonstrada para elastase e proteinase-3. Com exceção para catepsina G, que mostrou ação antiviral, porém sem clivagem de proteína F, sugerindo outro mecanismo para inativação do vírus, diferente deste apresentado (LOPES *et al.*, 2022).

Durante a infecção por hRSV, neutrófilos migram massivamente em direção à infecção, liberando as NETs (CORTJENS *et al.*, 2016). Mesmo sugerindo que exista efeito benéfico e que este seja, ao menos em parte, correspondente às enzimas das NETs, seu excesso é responsável por um efeito deletério ao hospedeiro. Em pacientes com infecção aguda, foi detectado a partir de lavados brônquicos, concentrações de fibras de DNA das NETs, resultando na viscosidade do muco, dificuldade de expectoração, resultando no aumento da resposta inflamatória no pulmão (ACKERMMAN *et al.*, 2021; CORTJENS *et al.*, 2016; FUNCHAL *et al.*, 2015; LEPPKES *et al.*, 2020; MCNAMARA *et al.*, 2003; NARASARAJU *et al.*, 2011; RADERMECKER *et al.*, 2020; VERAS *et al.*, 2020).

Estudos demonstram ocorrer interação entre as NETs com as partículas virais do vírus respiratório sincicial humano (hRSV), embora a identificação das moléculas que estariam envolvidas nessa interação, ainda não tenha sido completamente esclarecida (CORTJENS *et al.*, 2016). A compreensão dos mecanismos envolvidos desta interação pode representar um avanço na busca por estratégias eficazes no combate ao hRSV, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas eficazes na ação anti-hRSV.

2. OBJETIVOS

Investigar a identidade e a interação entre macromoléculas das NETs com partículas do hRSV, e se esta interação resulta na diminuição da infecção viral em células HEp-2.

Objetivos específicos:

- (a) Avaliar possíveis interações entre hRSV e proteínas das NETs;
- (b) Identificação proteômica das proteínas ligantes de hRSV;
- (c) Avaliar os efeitos destes ligantes no curso da infecção *in vitro* de amostras laboratoriais e clínicas de hRSV;
- (d) Avaliar o efeito virucida das NETs, elastase e catepsina-G sobre amostras laboratoriais e clínicas de hRSV.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

De acordo com os protocolos laboratoriais, para todos os ensaios que oferecessem risco de contaminação, foi utilizada a câmara de fluxo laminar (NB2) como medida de segurança. As soluções e vidrarias foram esterilizadas por autoclavação ou filtração através de poros de 0,22 μ m.

3.1. Declaração de ética

Os procedimentos de coleta de sangue, envolvendo a participação de voluntários humanos, foram todos realizados de acordo com o protocolo 48107321.9.0000. 5401, analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP.

3.2. Materiais

3.2.1. Reagentes

As enzimas neutrofílicas foram isoladas de leucócitos expectorados, adquiridas comercialmente na forma liofilizada: Mieloperoxidase (EPC ref. MY167), Catepsina-G (EPC ref. SG623) e Elastase (EPC ref. SE563). Para a solubilização e estocagem, seguiram-se as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich). Os inibidores das enzimas neutrofílicas foram adquiridos comercialmente na forma liofilizada, PF-06281355 (Sigma-Aldrich ref. PZ0277), M0398 (Sigma-Aldrich ref. 65144-34-5) e Chymostatin (Roche ref. 11004638001).

3.2.2. Cultura celular

Células derivadas de carcinoma de orofaringe (HEp-2) e adenocarcinoma pulmonar (A549), obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil), foram mantidas em garrafas de cultura de 25cm² com meio de cultura DMEM F12 (Sigma, D8900), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas SP) e acrescido de antibiótico-antimicótico (Thermo, 15240-062), em estufa umedecida à 37° C e 5% de CO₂.

3.2.3. Estoque viral

O vírus hRSV, cepa Long A2, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, Brasil). Os isolados clínicos hRSV A - POA 43/2018 e hRSV B - POA 10/2018 foram um presente da Dra. Ana Paula Duarte de Souza (PUCRS, Porto Alegre, Brasil). Todos os isolados virais foram amplificados em culturas de células HEp-2. Em garrafas de cultura de 75 cm², contendo monocamadas de HEp-2, as alíquotas virais foram inoculadas e incubadas em estufa à 37°C por 1 hora em agitação a cada 15 minutos (etapa de adsorção viral). Em seguida, retirou-se o inóculo, a cultura foi mantida com DMEM F12 incompleto (sem SFB), em estufa umedecida à 37° C e 5% de CO₂. As células inoculadas foram observadas com a ajuda de microscópio óptico, diariamente, por cerca de 6 dias, até o aparecimento do efeito citopático (ECP). O sobrenadante, contendo o vírus replicativo foi coletado, aliquotado e estocado em DMEM F12 incompleto acrescido com 10% de trealose e 20% de SFB, para então ser armazenado no ultrafreezer -80°C, até o momento do uso. A titulação viral foi estabelecida através do método de redução de placas de lise (MCKIMM-BRESCHKIN, 2004).

3.3. Métodos

3.3.1. Isolamento de neutrófilos

A partir de indivíduos declarados saudáveis, foi coletado 20 mL de sangue periférico, em tubetes, contendo citrato de sódio (BD biosciences). No fluxo laminar, foram preparados os gradientes de separação com Histopaque 1119 e 1077 (Sigma-Aldrich), 3 mL de cada densidade por falcon. Delicadamente, foi adicionado 6 mL de sangue nos respectivos tubos.

As amostras foram submetidas à centrifugação por 30 minutos, 277 xg, 25°C, sob aceleração e frenagem mínimos. Após a centrifugação, formou-se um gradiente delimitando 4 camadas de acordo com os constituintes sanguíneos. A primeira (plasma) e a segunda camadas (monócitos) foram descartadas em hipoclorito (5%).

Coletou-se a terceira camada (neutrófilos e gradiente de separação) e a última fase (hemácias) foi descartada juntamente às outras. Para lavar os neutrófilos coletados num falcon (50 mL), o qual foi preenchido com 45 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) e novamente centrifugado (5 minutos a 800 xg). Na sequência, o sobrenadante foi descartado em hipoclorito e, o *pellet* ressuspensão em 1 mL de PBS. Os neutrófilos foram diluídos 20 vezes em solução de Turk (20 mL ácido glacial, 0,5 g azul de metileno e água para 1L) para a contagem global de células, realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany).

3.3.2. Geração de NETs

Os neutrófilos isolados foram diluídos em DMEM F12 incompleto ($6,0 \times 10^5$ neutrófilos/mL). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas 3 placas de petri, previamente autoclavadas. Adicionou-se a suspensão de neutrófilos 25 nM de PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato, Sigma-Aldrich), com incubação de 3h em estufa umedecida à 37° C e 5% de CO₂. O sobrenadante foi gentilmente descartado, e as NETs foram lavadas e coletadas com o auxílio de 1 mL de PBS. As amostras utilizadas em eletroforese, foram submetidas a banho-seco por 20 minutos, com a adição de DNase (1 µg/mL, Sigma-Aldrich). O estoque de NETs foi armazenado no freezer -20°C.

3.3.3. Quantificação e caracterização das NETs

Para a quantificação do DNA das NETs, foi utilizado o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Inc, Grand Island, NY, USA) através do kit PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Em adição à quantificação, a presença dos complexos de DNA-elastase e DNA-MPO foram verificados através do ensaio de Elisa (RADA, 2019). Para tanto, uma placa de 96 poços já sensibilizada (*overnight* a 4°C) com anticorpos anti-elastase (1:1500; PA5-29659, ThermoFisher Scientific) ou anti-MPO (1:1000; ref. PA5-16672, ThermoFisher Scientific), foi bloqueada por 2h a temperatura ambiente com gelatina 5%, e então incubada com amostras de NETs ou PBS (*overnight* a 4°C). Após lavagem com PBS-Tween 20, os poços receberam anticorpo anti-DNA conjugado a peroxidase

(1:500; Kit Cell Death Detection; Roche), seguido de incubação por 1h a 37°C. A presença dos complexos foi revelada com a adição do substrato TMB peroxidase para ELISA (ThermoFisher, Invitrogen). Ao final, a reação foi paralisada com a adição de HCl 1 M e sua leitura de absorbância foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro.

Finalmente, o perfil eletroforético das NETs foi avaliado em gel de matriz de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie blue* (Sigma-Aldrich, ref. B8647).

3.3.4. Identificação de ligantes das NETs para o hRSV

A interação entre partículas de hRSV com proteínas das NETs foi avaliada em ensaios de *Western Blotting* e Imunoprecipitação.

Para os ensaios de Western Blotting, as amostras de NET foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, e então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Thermo Fisher Scientific) sob voltagem de 45 V durante 2h30. A membrana foi bloqueada com solução PBS-Tween20 0,05%, acrescido de 5% de leite desnatado, e incubada com hRSV (1:20) ou mock (1:20) (*overnight*, 4°C). No dia seguinte, a membrana foi mantida em solução de Palivizumabe (200 µg/ mL) por 1h30, para então ser incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:4000 por 1 h). A presença de interação foi avaliada com a adição do substrato TMB para *western blotting* (Thermo Fisher Scientific). Em paralelo, amostras de NET, submetidas a eletroforese e não transferidas, foram apenas coradas com *Coomassie blue* para extração de bandas de interesse a serem submetidas ao sequenciamento de peptídeos.

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados de modo a verificar se haveria precipitação do complexo RSV-NETs, mediada pela presença do anticorpo Palivizumab (anticorpo específico para a proteína F do RSV). Para tal, foi utilizado o *kit Invitrogen™ Dynabeads™ Protein A for Immunoprecipitation* seguindo as recomendações do fabricante. Em resumo, 50 µl das *beads* magnéticas foram adicionadas em eppendorfs de 1,5 mL, juntamente com 5 µg do anticorpo específico para hRSV, o Palivizumab, na concentração de 1 mg/ml, acrescido de 200 µL da solução *Biding & Washing* do kit. Após 20 minutos de incubação, sob agitação constante e delicada, as *beads* foram isoladas com o auxílio de um ímã, e o sobrenadante foi descartado. Ainda isoladas, as *beads* foram lavadas com a mesma

solução usada anteriormente, antes de receber 1 mL de hRSV para incubação de 1 hora sob agitação (as amostras-controle receberam apenas PBS ou Mock). Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado e as *beads* lavadas 3 vezes com solução *Washing*. Na sequência, as *beads* foram incubadas por 2 h com 700 μ L de NET, na concentração de 5,3 μ g/mL, quando o sobrenadante foi novamente descartado e as *beads* lavadas. Para a recuperação do imunocomplexo, utilizamos o método desnaturante indicado pelo fabricante, no qual as *beads* são incubadas por 10 minutos à 70°C na presença de 15 μ L da solução *Elution buffer* juntamente com 15 μ L de tampão de amostra Laemmli 2X. Por fim, as *beads* foram isoladas com auxílio de um ímã e o sobrenadante recuperado para análise eletroforética.

3.3.5. Sequenciamento de peptídeos

O gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie foi utilizado para extração daquelas proteínas ligantes de hRSV, e identificadas pelo *Western Blotting*. A banda correspondente ao peso molecular de 50kDa-75kDa foi extraída com o auxílio de um bisturi e submetida ao sequenciamento de aminoácidos após remoção do corante, redução e alquilação, digestão proteica e obtenção dos peptídeos.

Á partir de então, todos os procedimentos envolvidos no sequenciamento de peptídeos foram realizados em colaboração com o Dr. Daniel Martins de Souza, docente da Unicamp. Brevemente, a banda foi descorada com sucessivas lavagens por metanol 50% em água, contendo ácido acético 5%. Em seguida, foram feitas várias etapas de desidratação por acetonitrila e hidratação por bicarbonato de amônio 100 mM. As bandas foram reduzidas com DTT 5 mM (30 minutos a temperatura ambiente) e alquiladas com iodoacetamida 50 mM (30 minutos a temperatura ambiente, no escuro). Após, amostras foram lavadas com bicarbonato de amônio 100 mM e submetidas à clivagem enzimática por tripsina (20 μ g/mL) por 18h. Os peptídeos foram extraídos com as soluções de ácido fórmico 5% em água, e acetonitrila 50% em água contendo ácido fórmico 5%.

Os peptídeos foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa – RP-HPLC (20A Prominence, Shimadzu Co., Japão), acoplada à espectrometria de massas. Para isso utilizou-se uma coluna C18, com um gradiente de 5 a 40% de solvente B em 40 minutos, sendo o solvente A ácido

fórmico / água (1:1000) e solvente B ácido fórmico / acetonitrila / água (1:900:100), sob fluxo constante de 0,2 mL/min.

Para espectrometria de massa tipo electrospray, as análises foram realizadas em um instrumento IT-TOF (Shimadzu Co., Japão), em modo positivo, com obtenção dos espectros na faixa de 50 a 2000 m/z. A voltagem da interface foi utilizada em 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,85 kV, com temperatura de 200°C. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software LCMS Solution. O espectro dos fragmentos foi processado apropriadamente para análise através do Peaks Mass Spectrometry Software (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá), sempre com checagem manual para acuidade e correção dos dados e resultados.

3.3.6. Avaliação da identidade de MPO e de sua interação com o hRSV

A identidade de MPO em nossas amostras de NET e da sua interação com partículas de hRSV foram avaliadas em ensaios de *Western Blotting* e Elisa, respectivamente. Para tanto, amostras de NET (2,8 µg) e MPO purificada (320 ng) foram submetidas a eletroferese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, e então, transferidas (45 V durante 2h30) para uma membrana de nitrocelulose (Thermo Fisher Scientific). A membrana foi bloqueada com solução PBS-Tween20 0,05%, acrescido de 5% de leite desnatado (*overnight*, 4°C). No dia seguinte, as membranas foram incubadas *overnight* (4°C), na presença de hRSV (1:20), mock (1:20) ou PBS. A presença de MPO foi revelada com o uso de anticorpo específico anti-MPO (1:200; ref PA5-16672; Thermo Fisher Scientific). A presença de hRSV foi revelada com o uso de anticorpo específico Palivizumabe (200 µg/mL; Sinagis). Após incubação por 1h30, as membranas receberam anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:4000; Invitrogen™), incubadas por 1h. A presença de interação foi avaliada com a adição do substrato TMB para *western blotting* (Thermo Fisher Scientific).

Em complemento, a interação entre partículas de hRSV e MPO foram avaliadas em ensaios de ELISA. Para tanto, poços de uma microplaca foram sensibilizados *overnight* à 4°C com MPO purificada (12 µg/mL). No dia seguinte, os poços foram bloqueados com gelatina (1%; 2h à 37°C), para então, receberem RSV, PBS ou Mock. Após incubação *overnight* à 4°, os poços receberam anticorpo

específico Palivizumabe (200 µg/mL; 2h à 37°C), o qual foi revelado com a adição de anticorpo secundário conjugado a peroxidase (200 ng/mL; Invitrogen™, 45 minutos a 37°C). A presença de interação foi revelada com o uso de TMB para ELISA (Thermo Fisher Scientific). A leitura de absorbância foi realizada com o uso de espectrofotômetro em 450 nm, conforme recomendado pelo fabricante do TMB.

3.3.7. Avaliação da atividade antiviral das NETs, MPO, elastase e catepsina-G

As análises de atividade virucida foram realizadas em ensaios de viabilidade celular com o uso do sal de MTT, em diferentes protocolos. Para tanto, uma vez verificada a citotoxicidade de todos os compostos a serem avaliados, células HEp-2 ou A549 (5×10^4 /poço), ressuspensas em meio de cultivo DMEM F12, foram semeadas em placas de 96 poços (Corning ref. 3595), e incubadas em estufa umedecida a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. As monocamadas, em confluência de 80%, foram submetidas a diferentes protocolos de experimentação (descritos nas legendas de cada figura), mantendo o inóculo viral de hRSV (MOI 1,0). Após 72 horas, a viabilidade celular da monocamada foi mensurada pelo ensaio colorimétrico de MTT (SOLTAN-DALLAL *et al.*, 2017). Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de viabilidade ou de proteção celular, e para tanto, foram usadas as equações 1.1 e 1.2, respectivamente. Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo (CC, controle) foram consideradas como 100% viáveis (viabilidade máxima em condições de teste).

$$(equação 1.1.) \quad \text{Viabilidade celular (\%)} \times 100 = \frac{DO_T}{DO_{CC}}$$

DO Densidade óptica após leitura do sal de MTT em 560 nm;

DO_T Densidade óptica do grupo teste

DO_{CC} Densidade óptica do controle celular

(equação 1.2.)

$$\text{Proteção celular (\%)} \times 100 = \frac{DO_{AC} - DO_{CV}}{DO_{CC} - DO_{CV}}$$

DO_{AC} Densidade óptica da amostra pós leitura do sal de MTT em 560 nm;

DO_{CV} Densidade óptica do controle viral

DO_{CC} Densidade óptica do controle celular

3.3.8. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram processados através do software GraphPad Prism 6 e Microsoft Excel. A normalidade dos dados coletados foi aferida através do teste de Shapiro Wilk, a variância foi testada por one-way ANOVA, em adição pelo teste de Bonferroni. Quanto ao nível de significância, foi considerado $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização das NETs produzidas

Ainda que as NETs apresentem em maior quantidade DNA e histonas, fazem parte de sua estrutura uma diversidade de proteínas, entre as quais estão: catepsina-G, calprotectina, catelicidinas, defensinas, elastase, lactoferrina, lisozima C, mieloperoxidase (MPO), proteinase 3 e gelatinase (TAKEI *et al.*, 1996; URBAN *et al.*, 2009). Os mecanismos pelos quais as NETs são capazes de inativar patógenos ainda é um campo de estudo em expansão. Diferentes trabalhos mostram que a resposta microbida a diferentes microrganismos oportunos, está relacionada principalmente, às proteínas das NETs (ACHOUITI *et al.*, 2012; LAPPANN *et al.*, 2013).

A primeira etapa do nosso trabalho foi produzir, quantificar e caracterizar as NETs que seriam utilizadas nos ensaios futuros. A quantificação de DNA-livre foi realizada com o uso do Kit PicoGreen (Invitrogen). A presença de complexos DNA-elastase ou DNA-MPO, característicos das NETs foi avaliada por ELISA. Por fim, foi também avaliado o perfil eletroforético de nossas preparações.

As amostras de NETs, tratadas com DNase (1 µg/mL) de forma a diminuir os agregados gerados na coleta das NETs, apresentaram bandas de peso aparente próximo a 15, 50 e 75 kDa (Figura 3A). Como forma de controle, observamos que uma amostra contendo apenas DNase, apresentou uma única banda próxima a 50 kDa. Os ensaios de ELISA confirmaram a presença de complexos característicos das NETs, ou seja, Elastase-DNA e MPO-DNA (Figura 3B). A quantificação de DNA nestas amostras apontou uma variação de 1,86 – 5,3 µg/mL.

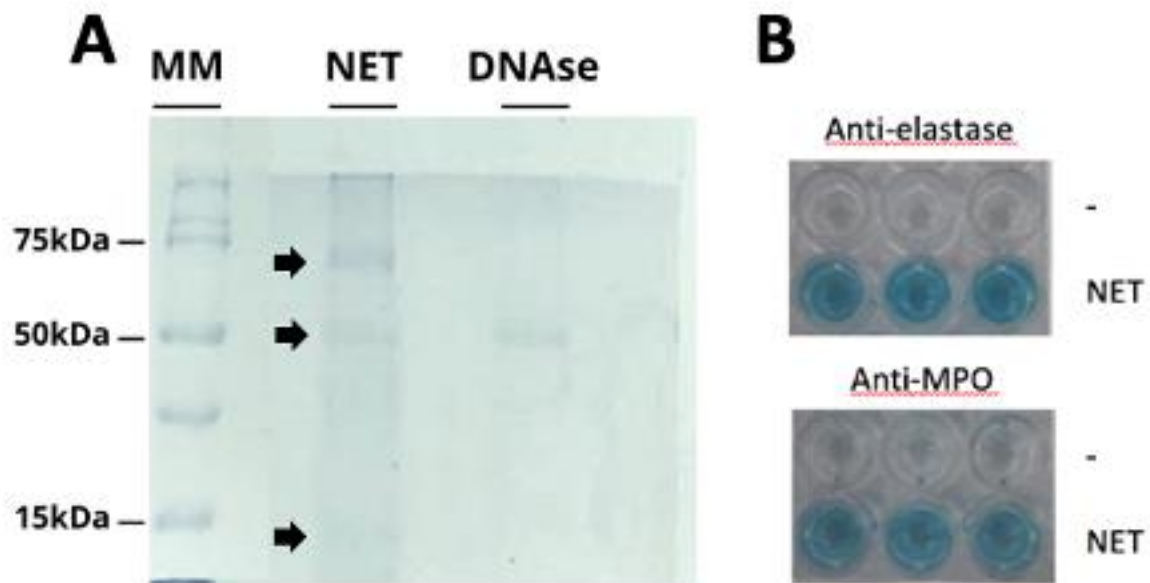


Figura 3. Perfil eletroforético das NETs. (A) Corrida eletroforética em matriz de poliacrilamida 12%, gel revelado em Coomassie blue, para estabelecer o perfil molecular proteico das amostras de NET (4,2 µg/mL) e DNase (1 µg/mL). Observou-se bandas próximas a 15, 50 e 75kDa. (B) Reação colorimétrica do ELISA referente a detecção de complexos DNA-elastase e DNA-MPO.

4.2. Identificação de ligantes das NETs para o hRSV

Estudos mostram que, durante a infecção por hRSV, a liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), pode ser mediada através da ativação dos neutrófilos, dependente dos receptores TLR-4, à proteína F viral (FUNCHAL *et al.*, 2015).

A proteína estrutural F do hRSV, é essencial para a fusão do vírus em células-alvo e replicação tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (KARRON *et al.*, 1997). NETs geradas por neutrófilos, apresentam mieloperoxidase e elastase neutrofílica, sendo estas sempre presentes na estrutura de DNA neutrofílico (PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010).

Mieloperoxidase e elastase, se mostram importantes para a geração de NETs, ambas com atividade antimicrobica (MCCORMICK *et al.*, 2011; METZLER *et al.*, 2011; SAITOH *et al.*, 2012). MPO apresenta função microbica para *S. Aureus*, bem como eficiente na eliminação do HIV-1 (PARKER *et al.*, 2012; SAITOH

et al., 2012). MCCORMICK *et al.* (2011), mostraram que a elastase das NETs foi capaz de inibir o crescimento de *A. fumigatus*.

Com relação aos efeitos gerados por algumas proteínas presentes nas NETs, a proteína quelante de zinco, calprotectina, possui ação microbicida contra *Candida* e *Klasiella* (URBAN *et al.*, 2006). A serino protease granular, catepsina-G, quando inibida diminui a ação microbicida das NETs, sugerindo que esta estaria relacionada ao mecanismo de neutralização contra patógenos (LAPPANN *et al.*, 2013; BRINKMANN *et al.*, 2004).

O efeito benéfico destas proteínas para o hospedeiro é evidente. Durante a infecção por hRSV, as NETs geradas no local infeccioso, impedem a disseminação de partículas virais ao longo do tecido pulmonar (CORTJENS *et al.*, 2016; DINIZ, L.F.A. *et al.*, 2021). Porém, o excesso de NETs, tem como consequência lesão tecidual, o que pode comprometer a função pulmonar, resultando no agravamento da patologia. O efeito deletério das NETs é decorrente das proteínas nela aderidas (LOPES *et al.*, 2022).

Estudos anteriores demonstram que elastase e proteinase-3 interagem com hRSV resultando em clivagem da proteína F viral, enquanto catepsina-G atua no microorganismo sem mecanismo ainda definido. SOUZA *et al.*, (2018), demonstrou haver interação de hRSV com uma proteína de ~50kDa sem obter sucesso em sua identificação. Para tentar esclarecer esta última questão, realizou-se ensaios de *western blotting* e imunoprecipitação (Figura 4). Amostras de BSA (albumina), NETs ou DNase, transferidas para membrana de nitrocelulose, foram incubadas com solução de hRSV long ou Mock, e então, submetidas ao reconhecimento específico por anticorpo anti-proteína F do hRSV, Palivizumab. De acordo com a figura 4, qualquer uma das incubações realizadas com BSA ou DNase não evidenciou qualquer banda que sustente uma hipótese de interação entre estas proteínas e o vírus RSV. A incubação de NET com mock ou na ausência de hRSV apresentou resultado semelhante as amostras anteriores. Por outro lado, foi possível observar o destaque de uma banda com peso molecular entre 50 kDa e 70 kDa, quando realizamos a incubação de hRSV com a membrana em que as NETs foram imobilizadas. Este resultado, somado aos controles realizados, sugere uma interação específica entre as amostras de NET e hRSV, além de corroborar com dados apresentados por nosso grupo de pesquisa (SOUZA *et al.*, 2018), referentes à

interação de moléculas das NETs de peso molecular de 50-75 kDa com o vírus sincicial respiratório.

Considerando-se os princípios que norteiam a técnica usada, a observação da banda de 50-75 kDa nos ensaios de *Western blotting* sugere que o hRSV interage com tal molécula de forma estável, na ausência de clivagem, ou na presença de efeito enzimático mínimo, que possibilite a manutenção e detecção de complexos enzima-vírus na membrana de nitrocelulose.

A figura 4B apresenta o perfil eletroforético de diferentes amostras de NETs, destacando-se a presença constante de uma banda de 50-75 kDa em todas elas.

Com a finalidade de reavaliarmos a interação do RSV com as NETs, *beads* magnéticas revestidas com proteína G foram incubadas com Palivizumab (anticorpo específico para proteína F do RSV). Na sequência, foram permitidos os contatos das *beads*/Palivizumab com hRSV long ou mock seguidos de NETs. O produto da eluição foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Figura 4C). Após a coloração do gel com azul de coomassie, observamos um padrão de bandas semelhante entre todas as amostras. No entanto, a incubação das *beads*/palivizumab com RSV e NETs evidenciou uma banda diferenciada, a qual apresenta o mesmo peso molecular aparente (50-75 kDa) e característico da interação entre RSV e NETs encontrada pelos nossos ensaios de *western blotting* (Figura 4A), e descrita por SOUZA *et al.*, (2018).

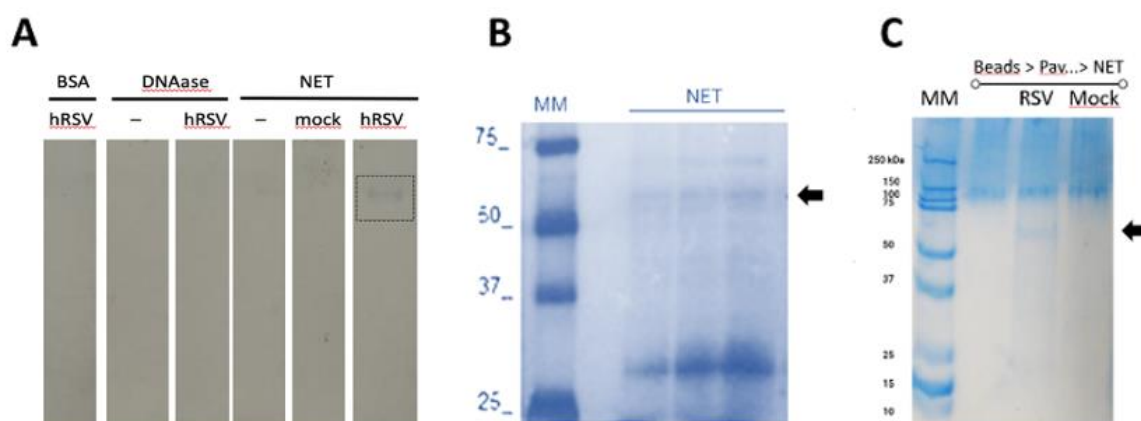


Figura 4. Interação das NETs com hRSV. (A) Diferentes amostras (BSA, DNase ou NET) foram submetidas a eletroforese e transferidas para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com diferentes amostras-teste (NET, RSV ou mock). A ocorrência de interação do RSV com algum alvo nas membranas foi investigada através do uso de anticorpo específico, Palivizumabe, seguido por anticorpo secundário conjugado a peroxidase, e por fim, TMB. Observa-se o destaque (retângulo pontilhado) de uma banda de peso molecular aparente de 50-75kDa. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida referente a diferentes amostras de NET e marcador molecular padrão (MM). Coloração em azul de comassie. A seta indica a banda de peso molecular aparente de 50-75kDa que foi destacada no ensaio de western blotting. (C) Destaca-se mais uma vez a banda de peso aparente de 50-75 kDa, obtida através de técnica de imunoprecipitação. As bandas de interesse foram submetidas a identificação proteômica.

Para compreender a identidade da(s) molécula(s) de peso molecular de 50-75kDa correspondente às NETs, e envolvidas na interação com o hRSV, utilizou-se análise proteômica, por meio de sequenciamento a partir de espectrometria de massa (3.3.7.).

As bandas correspondentes aquelas evidenciadas nos ensaios de *western blotting* e imunoprecipitação, foram extraídas dos géis de poliacrilamida corados com azul de comassie, e enviadas para sequenciamento em colaboração com o Dr. Daniel Martins de Souza, professor docente da Unicamp.

Após análise proteômica, identificaram-se as proteínas: mieloperoxidase, catepsina G, lactoferrina, defensina-1, alfa-actina, histona 2A e actina (Tabela 1), todas previamente descritas como moléculas que fazem parte da estrutura das NETs (BRINKMANN *et al.*, 2004; URBAN *et al.*, 2009).

Tabela 1- Resultado do sequenciamento correspondente à banda de 50-75kDa

Proteína	Peso molecular	Possui atividade anti-RSV?
Mieloperoxidase	Heterodímero de 60+12 kDa	~30%
Catepsina G	38 kDa	~65%
Lactoferrina	80 kDa	Não foi testada
Defensina-1	3,4 kDa	Não foi testada
Alfa-actina	42 kDa	Não foi testada
Histona 2A	~14 kDa	Não foi testada
Actina	42 kDa	Não foi testada

Fonte: autor, 05/09/2022

A mieloperoxidase (MPO) é um heterodímero com peso molecular de 140-155 kDa, estruturalmente formada por 4 cadeias, 2 leves com 12kDa e, 2 pesadas com peso variável (~60 kDa) de acordo com o nível de glicosilação (KOCH *et al.*, 2021). Esta é a única proteína que apresenta em sua estrutura uma cadeia pesada de peso molecular semelhante àquele encontrado em nossos ensaios de *western blotting* e imunoprecipitação. Além disso, ela foi a única que repetidas vezes foi identificada nas diferentes análises proteômicas realizadas.

De acordo com LOPES *et al.* (2022), em ensaios de avaliação antiviral, MPO foi capaz proteger células HEp-2 da morte celular causada pela infecção *in vitro* por hRSV. Esta proteção foi de aproximadamente 30%, e associada aos nossos dados, sugere que MPO seja um dos ligantes de hRSV nas NETs.

A mieloperoxidase humana é traduzida a partir de um gene de 14 kb que se encontra localizado no cromossomo 17q. Seu processo de síntese é complexo e necessita de etapas como adição do grupo heme, eventos proteolíticos e dimerização (HANSSON *et al.*, 2006). Esta proteína representa cerca de 5% do peso seco proteico de neutrófilos (FURTMULLER *et al.*, 2006).

Apesar de poucos trabalhos abordarem sua interação com vírus, vale ressaltar que um de seus principais mecanismos microbicidas é a produção de ácido

hipocloroso, o mais potente agente com ação microbicida entre os mamíferos. Além disso, como já foi citado, ela desempenha papel importante quanto a liberação das NETs (FURTMULLER *et al.*, 2006; METZLER *et al.*, 2011; PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010)

Para verificar a hipótese de que MPO corresponde a banda de 50-75 kDa, ligante de hRSV, realizamos a identificação da enzima através do reconhecimento de anticorpo específico em ensaios de *western blotting*, e avaliamos sua interação com hRSV em ensaios de ELISA (Figura 5). Anticorpo específico anti-MPO foi eficiente em reconhecer MPO purificada, a qual foi imobilizada em membrana de nitrocelulose (Figura 5A). O reconhecimento foi destacado por uma banda próxima a 50 kDa. Este mesmo anticorpo evidenciou banda de peso molecular semelhante nas amostras de NET submetidas a eletroforese e imobilização em membrana de nitrocelulose (Figura 5A). Estes resultados, reforçam que a identidade da banda de 50-75 kDa observada anteriormente seja MPO.

Na sequência, avaliamos se MPO purificada seria capaz de interagir com hRSV. Para isso, uma placa de 96 poços teve alguns de seus poços sensibilizados (*overnight*, a 4°C) com PBS, MOCK ou hRSV. As interações não específicas foram bloqueadas (2h, a 37°C) com gelatina a 1% antes de receberem MPO 12 µg/mL durante a noite (a 4°C). Os poços foram lavados com PBS, incubados (2h, a 37°C) com Anti-MPO (200 µg/mL), lavados novamente e incubados (45min, a 37°C) com anticorpo conjugado com peroxidase (200 ng/mL). Após nova lavagem, eles receberam o substrato TMB (Thermo Fisher Scientific), específico para ensaios de ELISA. A reação colorimétrica foi interrompida usando HCl (1 M) e quantificada via leitura de absorbância a 450 nm.

Como resultado observamos que, nos poços em que houve adição de hRSV, a reação colorimétrica foi de aproximadamente 2x maior, e estatisticamente significativa, quando comparada àquelas verificadas na presença de PBS ou Mock (Figura 5B).

Em conjunto, os resultados apresentados até o presente momento neste trabalho, e relacionados aos dados previamente descritos na literatura, demonstram que MPO presente nas NETs captura partículas de hRSV, promovendo uma proteção celular de aproximadamente 30% (Lopes *et al.* 2022), na ausência de clivagem da proteína F (Lopes *et al.*, dados ainda não publicados).

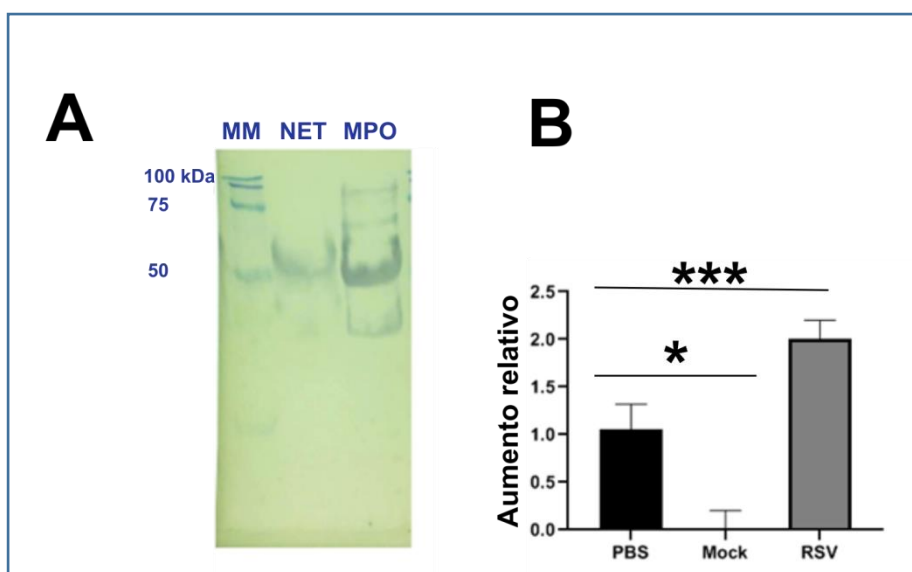


Figura 5. Interação entre MPO e hRSV. (A) Anticorpo específico anti-MPO foi capaz de reconhecer MPO purificada e a banda de 50-75kDa presente nas NETs. (B) MPO purificada promoveu interação com hRSV em ensaios de ELISA. Este resultado foi estatisticamente significativo quando comparado com as amostras de PBS e Mock.

SOUZA *et al.* (2018) descreveram a atividade virucida das NETs. Na sequência, Lopes *et al.* (2022) ao infectarem células HEp-2 com partículas virais pré-tratadas com MPO, observaram proteção de 30% da monocamada celular. Aqui, tivemos por objetivo estender o conhecimento à cerca do impacto de MPO na replicação do vírus RSV, e para tanto avaliamos isolados laboratoriais e clínicos.

Em modelos experimentais *in vitro*, para compreender o efeito de compostos em meio a diferentes concentrações, faz-se o uso de cultura celular. Vale ressaltar que, manter as condições essenciais de cultivo de células é imprescindível, uma vez que são sensíveis à temperatura, pH, umidade e CO₂. Portanto, controlar as condições experimentais favoráveis à cultura celular, é importante para obter resultados mais robustos, sem que haja interferência das condições instáveis (MOSMANN, 1983).

A exposição de determinados compostos às células pode comprometer a integridade e/ou metabolismo celular delas, o termo referente a estas condições é denominado citotoxicidade. Normalmente, utiliza-se a microscopia para acompanhar os efeitos morfológicos durante o período de teste, em adição ensaios colorimétricos são empregados com o intuito de verificar células viáveis ou não (PATEL *et al.*, 2009).

A atividade mitocondrial pode ser inferida por meio de sais de tetrazólio, somente as mitocôndrias apresentam enzimas desidrogenases capazes de reduzir o sal de tetrazólio, portanto a reação ocorre somente em células metabolicamente ativas (BÚFALO *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi utilizado o sal de MTT, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (SOLTAN-DALLAL *et al.*, 2017) em solução se apresenta na cor amarela, porém quando é reduzido pela succinato desidrogenase produz o sal de formazana, correspondente a cor roxa, como demonstrado na figura 6.

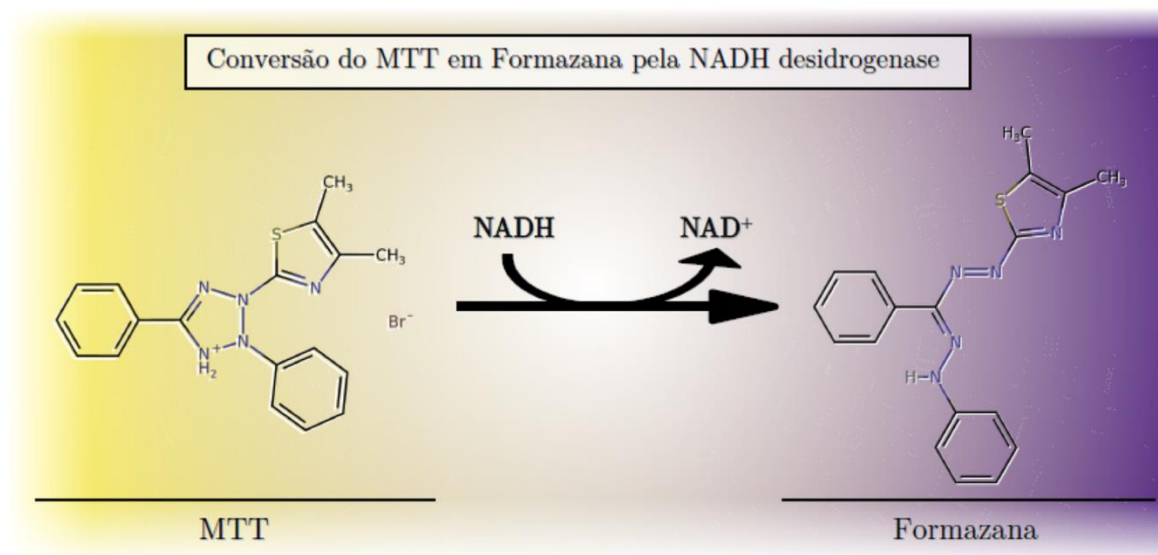


Figura 6. Metabolização do sal de tetrazólio em formazana. O sal penetra nas células onde é reduzido por enzimas associadas à membrana de mitocôndrias. A viabilidade celular pode ser inferida proporcionalmente à formação de formazana, quanto maior a intensidade da cor roxa, maior é a viabilidade celular. Fonte: adaptado de LOPES *et al.*, 2022

O ensaio de MTT é amplamente utilizado para inferir a viabilidade celular, devido a sua simplicidade, custo-benefício e robustez na entrega de dados. A quantidade de formazana produzida na reação é proporcional ao nível de atividade das células. Em uma determinada linhagem celular, é possível correlacionar a densidade de cristais de formazana produzidos em condição controle, de acordo com os níveis de formazana da monocamada exposta ao composto testado, dessa forma é possível traçar um comparativo e estabelecer o efeito citotóxico do composto à linhagem celular testada (SOLTAN-DALLAL *et al.*, 2017).

O inibidor PF-06281355 [6-(2,5-Dimethoxyphenyl)-3,4-dihydro-4-oxo-2-thioxo-1(2H) pyrimidineacetamide], apresenta potencial e seletividade quanto à inibição de enzimas peroxidases, à exemplo de mieloperoxidase. Em um trabalho utilizando modelos *in vivo* tratados com LPS, demonstrou que o inibidor foi capaz de diminuir a atividade de MPO do plasma de forma significativa, sugerindo seletividade no processo de inibição (RUGGERI *et al.*, 2015). A atividade *in vitro* de mieloperoxidase foi reduzida em células de leucemia promielocítica (HL60) (BACHMANN *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2015).

A mieloperoxidase é um importante alvo terapêutico, por ser essencial na modulação da resposta inflamatória, incluindo a liberação de citocinas, em diversas patologias (YASUAKI, 2018). De forma distinta às outras enzimas utilizadas neste trabalho, esta peroxidase apresenta capacidade em catalisar gerando espécies reativas de oxigênio, como ozônio e oxigênio singlete, embora apresente potencial em produzir compostos altamente tóxicos, foi demonstrado por LOPES *et al.*, (2022) que seu efeito não foi citotóxico para a linhagem celular HEp-2, mesmo em doses elevadas.

Neste trabalho, utilizamos o inibidor PF-06281355 de maneira direcionada a reduzir a atividade enzimática de MPO, de forma a avaliar se tal atividade estaria relacionada ao seu efeito anti-RSV. As concentrações testadas foram baseadas de acordo com o levantamento de dados na literatura e sugestão de concentração para trabalho fornecida de acordo com o fabricante (SIGMA-ALDRICH, ROCHE, BACHMANN *et al.*, 2018; RUGGERI *et al.*, 2015; SMEDLY *et al.*, 1986; STEIN, 1986; TATSUTA, 1973; ZHENG *et al.*, 2015).

Inicialmente, verificamos que o inibidor PF-06281355, incubado em diferentes concentrações (2,42-155,7 μ M) na cultura de células HEp-2 ou A549, não resulta em perda significativa da viabilidade celular daquelas culturas (Figura 7). Em paralelo, células HEp-2 foram infectadas com hRSV (Long e isolados clínicos hRSV-A e hRSV-B; MOI 1.0) previamente tratado com diferentes concentrações de MPO (1-32 μ M) (Figura 8, coluna da esquerda). A ação antiviral de MPO se mostrou significativamente dose-dependente, uma vez que o aumento da viabilidade celular acompanhou as crescentes concentrações testadas da enzima. Estes dados corroboram com aqueles achados por LOPES *et al.*, (2022) e se demonstram consistentes também para isolados clínicos. Além disso, o bloqueio dose-dependente do efeito virucida de MPO (32 μ M), quando incubada na presença do

inibidor PF-06281355 (3,04-389,25 μM), demonstra que sua atividade enzimática faz parte do mecanismo molecular envolvido na neutralização da partícula viral estudada (Figura 8, coluna da direita).

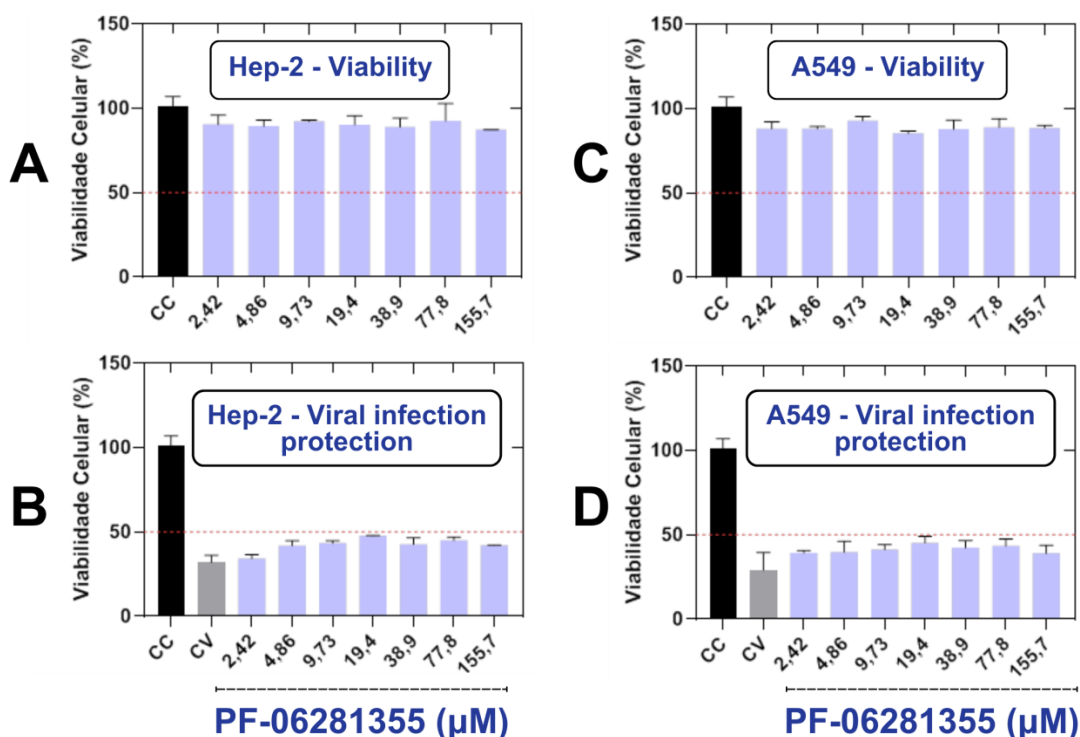


Figura 7. O inibidor de MPO (PF-06281355) não interfere na viabilidade celular e na infectividade do hRSV. Monocamadas de HEp-2 (A) ou A549 (C) foram incubadas por 2h com PF-06281355 (2,42-155,7 μM), seguindo-se cultura de 3 dias. Em paralelo, células HEp-2 (B) ou A549 (D) foram inoculadas com hRSV long (MOI 1,0) previamente incubado (1h; 4°C) com PF-06281355 (2,42-155,7 μM), seguindo-se cultura de 3 dias. A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT. Os dados representativos de 3 ensaios independentes, são representados como porcentagem da viabilidade celular, considerando células não infectadas e não tratadas (CC) como 100%. CC= controle celular; CV controle viral, onde as células foram infectadas, mas não tratadas. Os dados gerados foram tratados e convertidos para viabilidade celular (%), onde representa a média dos valores obtidos $\pm$ desvio padrão, utilizando $p \leq 0,05$.

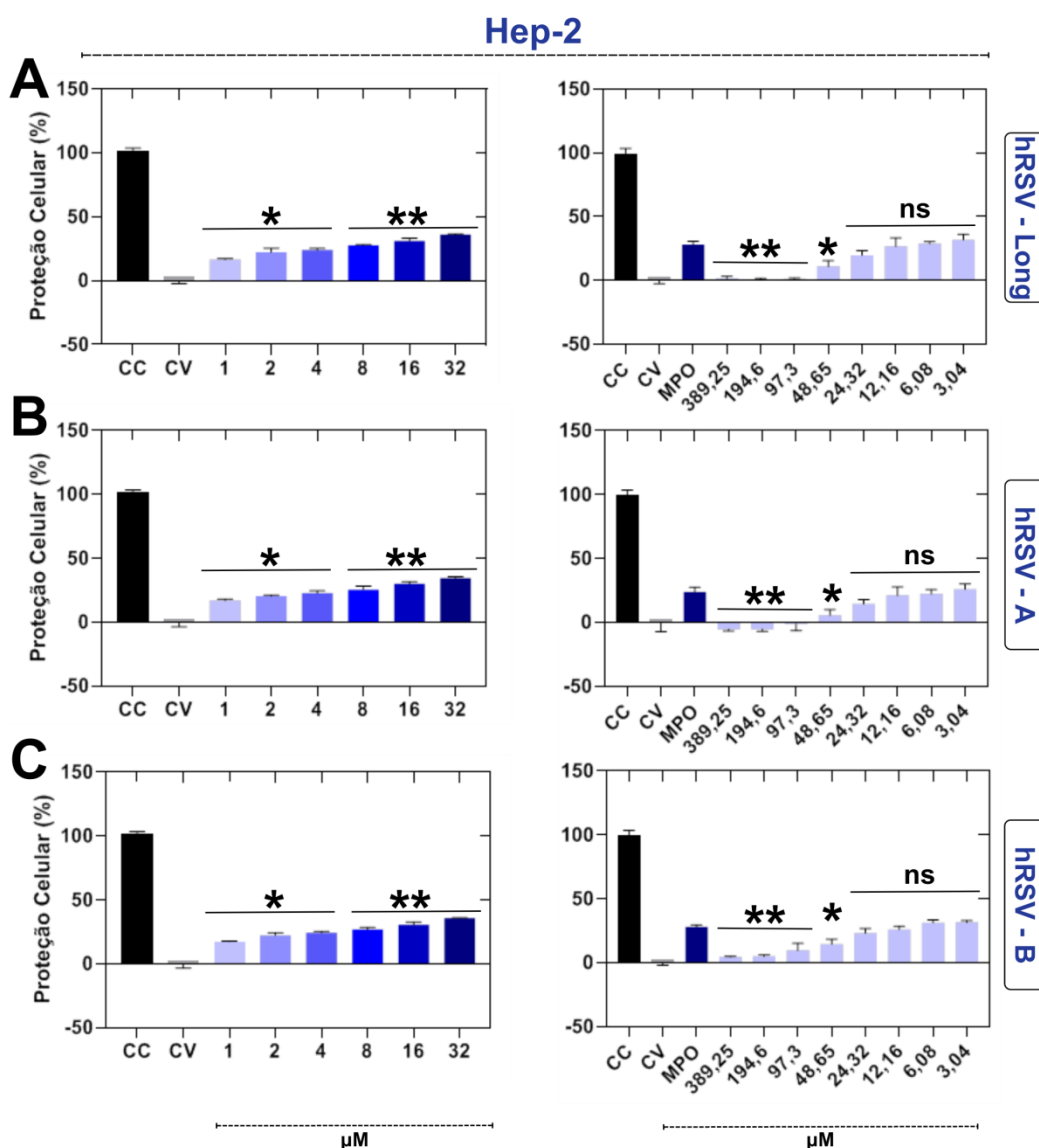


Figura 8. Ação de MPO e inibição desta utilizando PF-06281355. Na coluna da esquerda, monocamadas confluentes de HEP-2 receberam o inóculo (MOI 1,0) de hRSV Long (A), hRSV-A (B) ou hRSV B (C) tratado com MPO (1-32 µM). Na coluna da direita, monocamadas de HEP-2 receberam o inóculo (MOI 1,0) tratado com MPO (32 µM), previamente incubada ou não com PF-06281355 (3,04-389,25 µM). Após 3 dias de incubação em estufa umedecida, a viabilidade celular foi mensurada via adição do sal de MTT. Os dados gerados foram tratados e convertidos para proteção celular (%), onde representa a média dos valores obtidos $\pm$ desvio padrão, utilizando $p \leq 0,05$. A, B e C, coluna da esquerda, (*) para $p < CV$ quando comparado com 1, 2 e 4 µM; (**) para $p < CV$ quando comparado com 8, 16 e 32 µM. Coluna da direita, (**) para $p < MPO$ quando comparado com 389,25, 194,6 e 97,3 µM; (*) para $p < MPO$ quando comparado com 48,65 µM; (ns) para $p < MPO$ quando comparado com 24,32, 12,16, 6,08 e 3,04 µM.

Por fim, avaliamos a contribuição do efeito virucida de MPO na atividade anti-hRSV das NETs sobre isolados clínicos do vírus (Figura 9). Para tanto, células HEP-

2 ou A549 foram inoculadas com hRSV (MOI 1,0), previamente incubados com NETs (0,4 µg/mL), associadas ou não ao inibidor de MPO (PF-06281355 - 48,65 µM). A proteção celular foi avaliada após 3 dias de cultivo celular mensurando-se a absorção do sal de MTT metabolizado pelas células vivas. Primeiramente, PF-06281355, de forma isolada, não foi capaz de interferir com a infectividade viral. Demonstramos ainda, que as NETs apresentam efeito virucida sobre todos os isolados virais testados, incluindo os isolados clínicos. O tratamento das NETs utilizando o inibidor direcionado à MPO (PF-06281355 - 48,65 µM) resultou em reversão da sua atividade virucida para todas as cepas testadas em ambas as linhagens celulares (HEp-2 e A549), indicando que pelo menos parte do efeito virucida observado nas NETs está atribuído à ação da MPO. Além disso, esses dados, em conjunto com os resultados previamente apresentados, indicam que durante a infecção, a modulação finamente coordenada desta enzima pode desempenhar um papel protetor tanto para as células epiteliais quanto para as células endoteliais do tecido pulmonar, que são alvos do hRSV.

Em conjunto, estes dados demonstram que MPO contribui para a atividade virucida das NETs contra ao hRSV, por se tratar de um ligante para este vírus, e por agir enzimaticamente contra partículas virais de laboratório ou mesmo isolados clínicos.

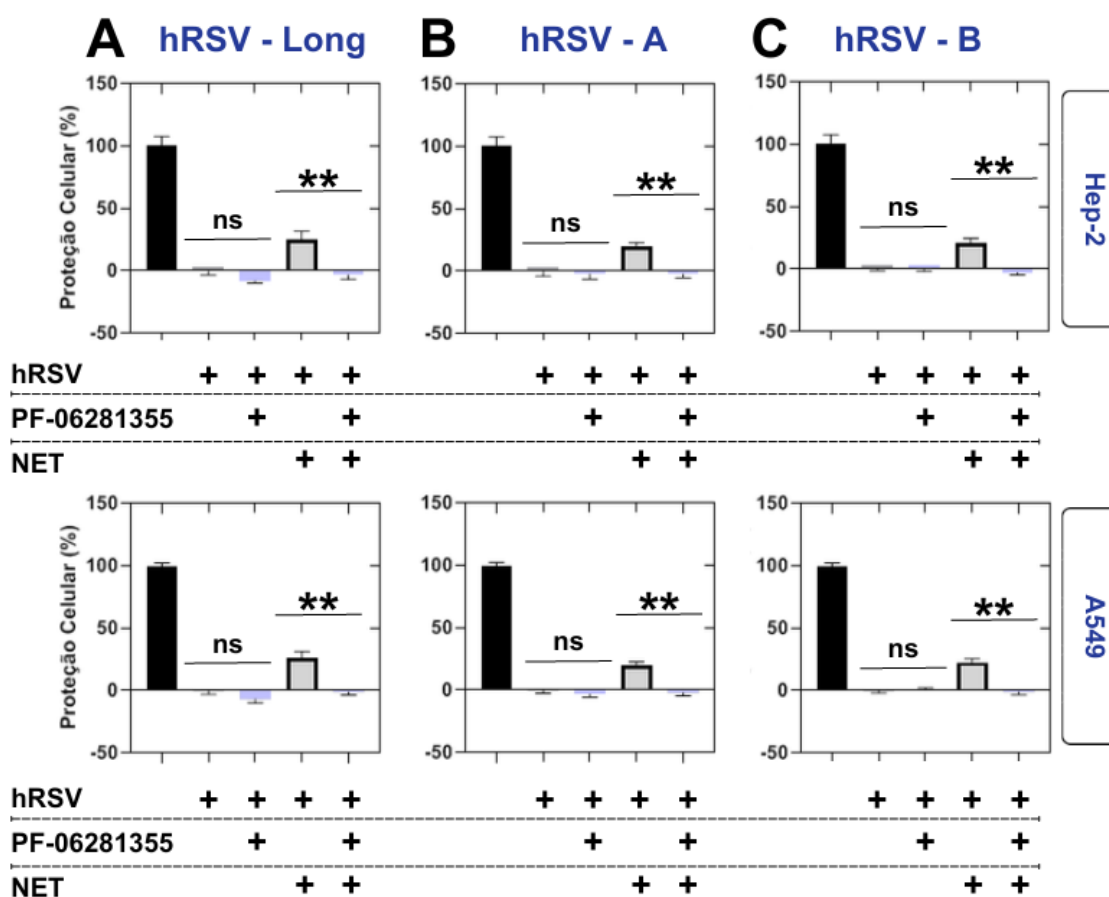


Figura 9. Inibição do efeito das NETs. A. B. e C. Monocamadas confluentes de HEP-2 ou A549 receberam o inóculo (20 µL/poço) de hRSV Long, hRSV A ou hRSV B (MOI 1,0) tratado com NETs (0,4 µg/mL) previamente tratadas ou não com PF-06281355 (48,65 µM). Após 3-5 dias de incubação em estufa umedecida, a viabilidade celular foi mensurada via adição do sal de MTT. Os dados gerados foram tratados e convertidos para viabilidade celular (%), onde representa a média dos valores obtidos $\pm$ desvio padrão, utilizando $p \leq 0,05$.

4.3. Elastase e Catepsina-G também atuam em isolados clínicos de hRSV

Como mencionado anteriormente, Souza et al (2019) demonstrou o efeito virucida das NETs sobre hRSV da cepa Long. Na sequência, Lopes et al (2022) esclareceu que este efeito virucida ocorria, ao menos em parte, ao efeito virucida de elastase e Catepsina-G contra a mesma cepa Long. Aqui, tivemos por objetivo estender tal conhecimento para isolados clínicos do hRSV. Para tanto, iniciamos nossa investigação pelos inibidores enzimáticos de elastase e catepsina-G, M0398 e Chymostatin, respectivamente.

O Chymostatin é um potente inibidor de muitas proteases, incluindo quimotripsina, serino proteases semelhantes à quimotripsina, quimases e

proteínases de cisteína lisossomal (catepsinas A, B, C, B, H e L). Na literatura, há relatos de inibição de forma fraca para a elastase de neutrófilos humanos, pois apresentam sítios ativos similares ao mesmo substrato, o que pode resultar em redução da atividade (TATSUTA *et al.*, 1973).

Três componentes fazem parte da composição estrutural do inibidor, os quais chamaremos de A, B e C. Sendo A N-[[((S)-1-carboxy-2-phenylethyl)-carbamoyl]- α -[2-iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl]-L-glycyl-L-leucyl-phenylalaninal. Quanto aos outros dois componentes, B e C diferem na medida em que o resíduo de L-leucila é substituído por L-valina e L-isoleucina, respectivamente (STEIN, *et al.*, 1987).

O N-(Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valine chloromethylketone (M0398) tem sido relatado como o inibidor mais eficaz para a elastase. Em um estudo, ele foi capaz de reagir com a protease de forma mais rápida, comparado a outros inibidores testados, sem haver inibição de catepsina G, sugerindo que há possibilidade em construir inibidores cada vez mais reativos e seletivos para situações fisiológicas (POWER *et al.*, 1977). Durante o choque séptico, a elastase da rede de neutrófilos degrada o plasminogênio, atividade esta que M0398 foi capaz de bloquear (CRUZ *et al.*, 2019).

Para elucidar o efeito dos referidos inibidores, na presença ou ausência de hRSV, bem como seu efeito citotóxico, estes foram testados em monocamadas confluentes de células HEp-2 e A549. A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT. De acordo com as figuras 10A e 10C, Chymostatin (2,57-164,5 μ M) e M0398 (0,007-0,5 μ M) não alterou a viabilidade das linhagens celulares testadas, se mostrando não citotóxicos para as concentrações utilizadas. Em paralelo, células HEp-2 e A549 foram infectadas com hRSV long (MOI 1,0) que foram ou não pré-incubados com Chymostatin (2,57-164,5 μ M) e M0398 (0,007-0,5 μ M). Em nenhuma das concentrações testadas, os inibidores de catepsina-G (chymostatin) e elastase (M0398) interferiram na infectividade viral, como demonstram as figuras 10B e 10D, respectivamente.

Cabe lembrar que, as concentrações dos inibidores aqui testadas foram baseadas de acordo com o levantamento de dados na literatura e sugestão de concentração para trabalho fornecida de acordo com o fabricante (SIGMA-ALDRICH, ROCHE, BACHMANN *et al.*, 2018; RUGGERI *et al.*, 2015; SMEDLY *et al.*, 1986; STEIN, 1986; TATSUTA, 1973; ZHENG *et al.*, 2015).

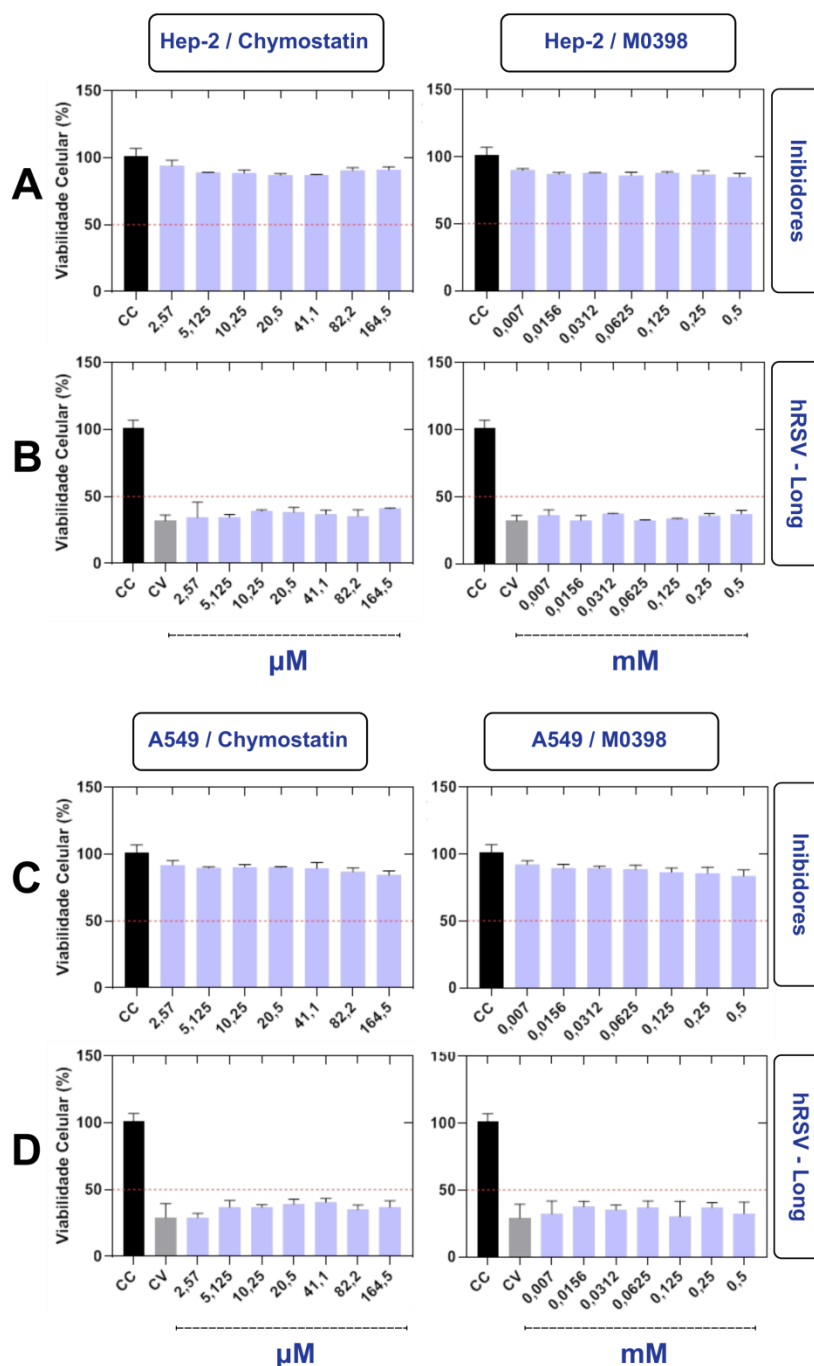


Figura 10. Inibidores de catepsina-G e elastase não interferem na viabilidade celular e na infectividade do hRSV. Monocamadas de HEp-2 (A) ou A549 (C) foram incubadas por 2h com chymostatin (2,57-164,5 μM) ou M0398 (0,007-0,5 μM), seguindo-se cultura de 3 dias. Em paralelo, células HEp-2 (C) ou A549 (D) foram inoculadas com hRSV long (MOI 1,0) previamente incubado (1h; 4°C) com chymostatin (2,57-164,5 μM) ou M0398 (0,007-0,5 μM), seguindo-se cultura de 3 dias. A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT. Os dados representativos de 3 ensaios independentes, são representados como porcentagem da viabilidade celular, considerando células não infectadas e não tratadas (CC) como 100%. CC= controle celular; CV controle viral, onde as células foram infectadas, mas não tratadas.

As proteases são essenciais para a regulação de vários processos fisiológicos: modulação de interações proteicas, processamento de sinalização molecular, resposta imune e, eliminação de patógenos (OHLSSON AND OHLSSON, 1974). A elastase é uma serino protease com peso molecular de aproximadamente 29 kDa, pertencente à família das quimotripsinas, madura, se encontra armazenada nos grânulos azurofílicos, sendo esta principal fonte, entretanto pode ser encontrada na superfície do neutrófilo (BIETH *et al.*, 1986). Além das funções previamente descritas, ela detém uma variedade de substratos hidrolisáveis, em especial elastina, o que pode favorecer a ação de proteólise (LEE AND DOWNEY, 2001). Evidências de altas concentrações no local da infecção sugerem que sua atividade possa estar correlacionada à lesão pulmonar aguda. Por isso, uma vez expressa durante processo infeccioso, sua regulação deve ser cuidadosamente orquestrada em conjunto aos inibidores endógenos, para não haver danos extensivos ao hospedeiro (KORKMAZ *et al.*, 2008). De maneira homóloga, catepsina G é uma serino protease armazenada nos grânulos azurofílicos, também encontrada na superfície de neutrófilos ativos, apresenta peso molecular de aproximadamente 24 kDa, sua estrutura corrobora para afinidade de moléculas positivamente carregadas. Desempenha funções imunológicas importantes como a modificação estrutural de quimiocinas e citocinas, ativação do sistema complemento e interação com receptores celulares (LINDMARK *et al.*, 1994; MCGUIRE *et al.*, 1993).

A dependência de atividade enzimática sobre o efeito anti-hRSV de elastase e catepsina-G foi testada na presença de seus inibidores, M0398 (0,25 mM) e Chymostatin (82,2 μ M), respectivamente. Para tanto foram utilizadas enzimas purificadas (1 μ M) em células HEp-2 e A549, testadas em diferentes linhagens de hRSV, de origem clínica e laboratorial, como mostra a figura 11.

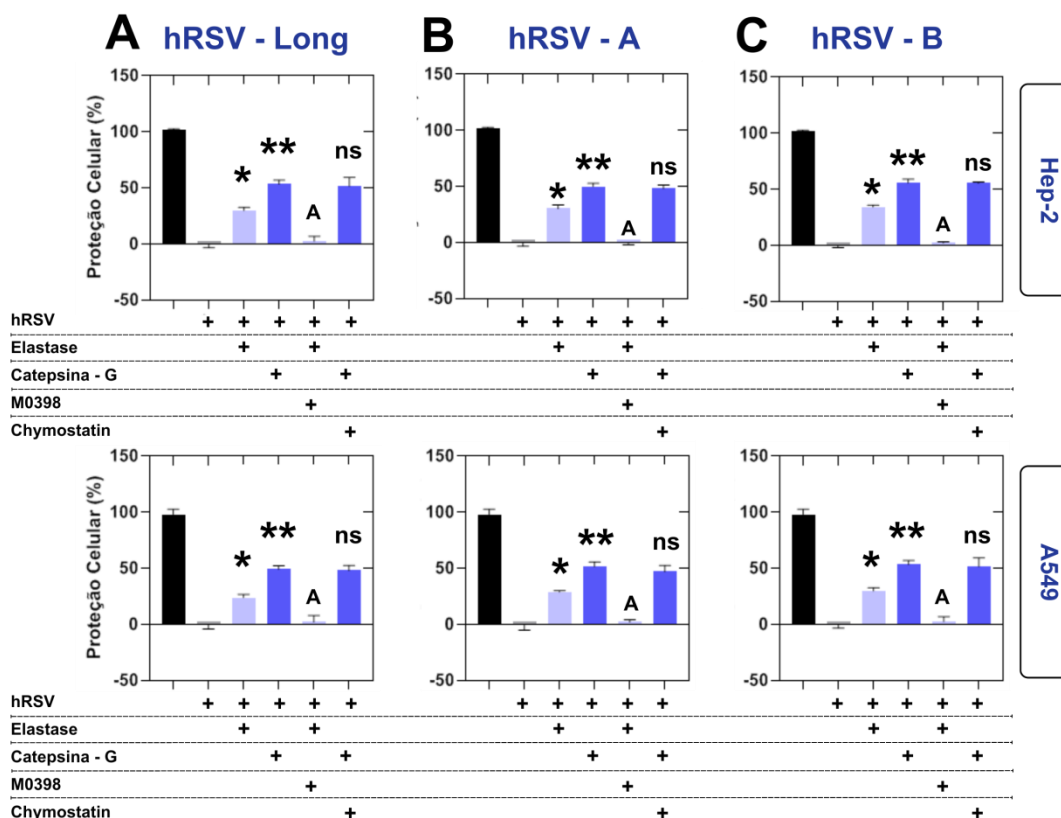


Figura 11. Atividade anti-hRSV. Monocamadas confluentes de HEp-2 ou A549 receberam o inóculo (MOI 1,0) de hRSV Long, hRSV A ou hRSV B (colunas A, B e C) tratado com elastase (1 μ M) ou catepsina-G (1 μ M), previamente incubadas ou não com M0398 (0,25 mM) ou Chymostatin (82,2 μ M). Após 3 dias de cultivo em estufa umedecida, a viabilidade celular foi mensurada via adição do sal de MTT. Os dados gerados foram tratados e convertidos para proteção celular (%), onde representa a média dos valores obtidos $\pm$ desvio padrão, utilizando $p \leq 0,05$. A, B e C, (*) para $p < CV$ quando comparado com elastase; (**) para $p < CV$ quando comparado com catepsina-G; (A) para $p < CV$ quando comparado com elastase/M0398; (ns) para $p < CV$ quando comparado com catepsina-G/chymostatin.

A utilização do inibidor (M0398, 0,25 mM) direcionado à elastase (1 μ M) resultou em significativa redução dos efeitos correspondentes à protease, uma vez que a infecção viral se mostrou efetiva para todas as cepas de hRSV testadas. Estes dados sugerem que a inativação das partículas virais ocorra via ação enzimática, com clivagem da proteína F pela elastase, como sugerido por LOPES *et al.*, 2022.

Células inoculadas com partículas virais, previamente tratadas com Catepsina G, exibiram significativa viabilidade celular, semelhante àquela apresentada por células não infectadas. Além disso, a inibição da atividade enzimática de catepsina-G por chymostatin (82,2 μ M) não interferiu em seu efeito virucida. Estes dados

corroboram com aqueles apresentados por LOPES *et al.*, 2022, em que catepsina-G não foi capaz de clivar a proteína F do vírus. O mecanismo anti-hRSV apresentado por Catepsina-G continua não esclarecido e demanda maiores investigações.

Dados da literatura demonstram que, ao menos parte da ação anti-hRSV exibida pelas NETs, está relacionada às enzimas encontradas nas redes de neutrófilos (CORTJENS *et al.*, 2016; FUNCHAL *et al.*, 2015).

A presença de elastase e mieloperoxidase em lavados brônquicos, sugere importância para infecção (MCNAMARA *et al.*, 2003). Além disso, *in vitro*, a catepsina G apresentou redução da quantidade e tamanho dos sincícios, com capacidade de proteção de maneira considerável da monocamada de HEp-2 (LOPES *et al.*, 2022). De forma semelhante, a elastase foi capaz de reduzir o número de sincícios, porém sem alteração no tamanho deles, protegendo a maior parte da camada celular (LOPES *et al.*, 2022). Estes dados somados à redução da ação antiviral através de inibidores direcionados às enzimas isoladas, nos leva a avaliar a atividade anti-hRSV das NETs, por meio da utilização daqueles mesmos inibidores.

Conforme representado na figura 12, e corroborando com dados anteriormente aqui demonstrados, observou-se que os inibidores Chymostatin e M0398 não afetaram a infectividade do hRSV em células HEp-2 e A549. Por outro lado, assim como demonstrado por SOUZA *et al.*, (2018), NETs apresentaram atividade virucida ao elevar a viabilidade de células infectadas com partículas virais pré-incubadas com NETs. Ambos os inibidores, direcionados a Elastase (M0398 – 0,25 mM) e Catepsina-G (Chymostatin – 82,2 µM) foram capazes de reverter aquele mesmo efeito observado nas NETs. Estes dados apontam para o fato de que, enzimas presentes nas NETs são, ao menos em parte, responsáveis por seu efeito antiviral. Por outro lado, este resultado sugere também que o inibidor Chymostatin direcionado a Catepsina-G, deve ser melhor avaliado. Tal conclusão ocorre, uma vez que, Chymostatin foi incapaz de inibir o efeito virucida de catepsina-G purificada (Figura 12), corroborando com os dados de LOPES *et al.*, (2022), que demonstrou a atividade anti-hRSV de catepsina-G na ausência de clivagem da proteína F viral.

Uma das hipóteses levantadas por nós é de que o inibidor Chymostatin possa ter agido sobre outras enzimas presentes nas NETs, e que também apresentam ação anti-hRSV. Dentre elas, podemos citar elastase e proteinase-3, que por serem

quimiotripsinas compartilham sítios ativos semelhantes a catepsina-G (KORKMAZ *et al.*, 2008).

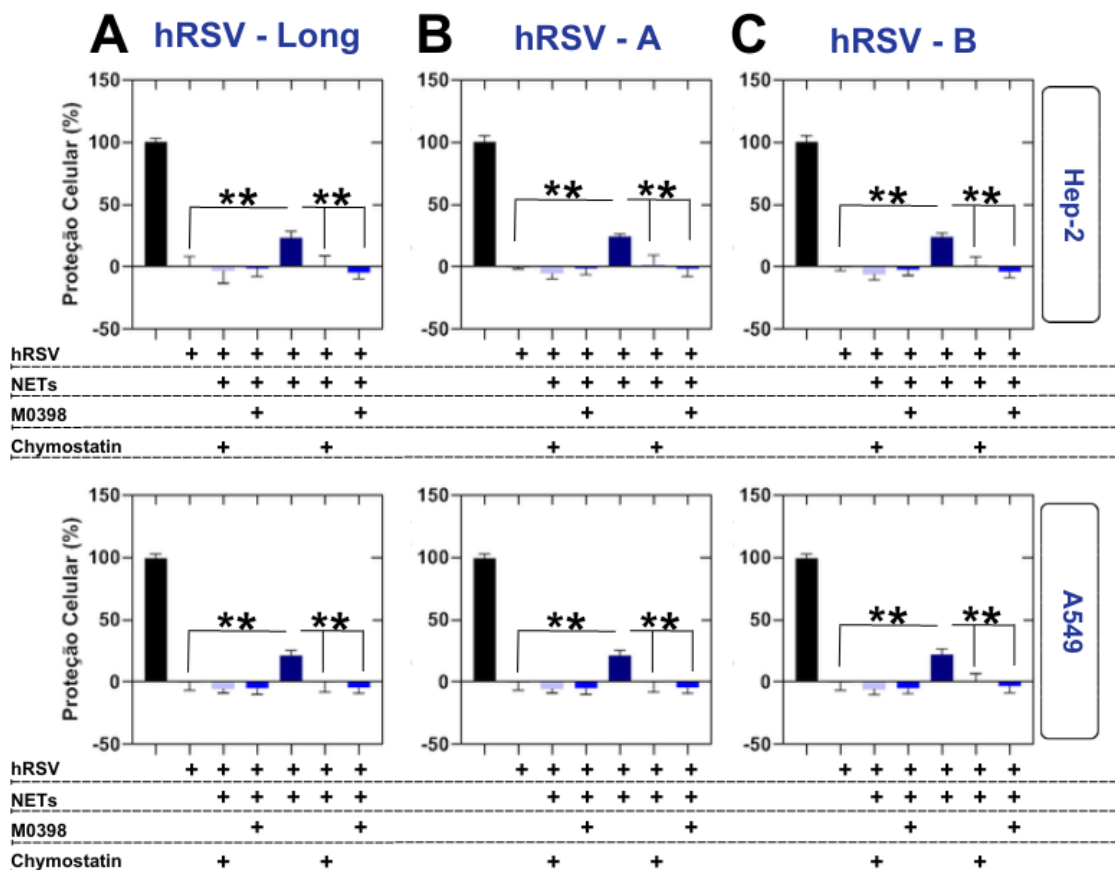


Figura 12. Redução da ação virucida das NETs. A. B. e C. Monocamadas de HEp-2 ou A549 foram inoculadas com hRSV (MOI 1,0) pré-tratado ou não com NETs (0,4 µg/mL) e/ou inibidores enzimáticos direcionados a elastase (M0398/ 0,25 mM) e catepsina G (chymostatin/ 82,2 µM). A viabilidade celular foi mensurada através da revelação por MTT, após 3-5 dias de infecção. Os dados gerados foram tratados e convertidos para viabilidade celular (%), onde representa a média dos valores obtidos ± desvio padrão, utilizando $p \leq 0,05$.

Em conjunto, estes dados demonstram que NETs apresentam efeito virucida contra isolados laboratoriais e clínicos de hRSV, e que este efeito se deve, ao menos em parte, a ação enzimática de elastase sobre o vírus e catepsina-G, quem ainda não teve seu mecanismo descrito.

5. CONCLUSÕES

O efeito virucida das NETs se deve, ao menos parcialmente, a interação de MPO, elastase e catepsina-G com partículas de hRSV. Onde, MPO e elastase danificam a partícula viral por agirem enzimaticamente, enquanto que catepsina-G ainda não teve seu mecanismo descrito.

À luz da literatura atual, em resposta à infecção por hRSV, os neutrófilos migram para o local infeccioso onde liberam as NETs, e seus efeitos benéficos ou deletérios estarão sob um delicado controle em função de sua concentração. Neste trabalho, nossos resultados demonstram que MPO presente nas NETs se apresenta como ligante de partículas de hRSV. Além disso, a utilização de inibidores direcionados às enzimas reduziram o efeito antiviral das NETs, sugerindo que, de fato, ao menos em parte, esta atividade esteja relacionada ao papel enzimático de proteases.

Os mecanismos pelos quais ocorre inativação do vírus, ainda não está totalmente claro. Elastase e Proteinase-3 são capazes de inativar a partícula viral por clivagem da proteína F viral, enquanto que MPO ainda não teve seu alvo identificado. Por outro lado, catepsina G reduz a infectividade viral na ausência de ação enzimática.

Em adição aos dados aqui apresentados, há necessidade de mais estudos acerca de MPO e Catepsina – G para esclarecer seu papel quanto ao efeito anti-hRSV, de maneira a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias, auxiliando no controle da infecção pelo hRSV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. LINDMARK, U. GULLBERG, I. OLSSON **Processing and intracellular transport of cathepsin G and neutrophil elastase in the leukemic myeloid cell line U-937- modulation by brefeldin A, ammonium chloride, and monensin.** J. Leukoc. Biol., v. 55, 1994.
- ACHOUITI A, *et al.* **Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in Gram-negative pneumonia derived sepsis.** Plos Pathog, v. 8, n. 10, 2012.
- ACKERMAN, M., *et al.* **Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils.** Cell death and differentiation, v. 28, n. 11, p. 3125–3139, 2021.
- AMULIC, B., *et al.* **Neutrophil function: from mechanisms to disease.** Annu. Rev. Immunol., n. 30, p. 459–489, 2012.
- ARAUJO, G.C. *et al.* **Structure and functional dynamics characterization of the ion channel of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein (SH) transmembrane domain by combining molecular dynamics with excited normal modes.** J. Mol. Model., v. 22, n. 286, 2016.
- ARNOLD, R. *et al.*, **Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells.** Virology, n. 330, p. 384–397, 2004.
- B. AMULIC, *et al.*, **Neutrophil function: from mechanisms to disease.** Annu. Rev. Immunol., n. 30, p. 459-489, 2012.
- B. CORTJENS, *et al.* **Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease.** J. Pathol., n. 238, p. 401-411, 2016.
- BACHMANN, FABIO, *et al.* **N-demethylation of N-methyl-4-aminoantipyrine, the main metabolite of metamizole.** European journal of pharmaceutical sciences, n. 120, p. 172-180, 2018.
- BAKKER, S.E. *et al.* **The respiratory syncytial virus nucleoprotein-RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid.** J. Gen. Virol., n. 94, p. 1734–1738, 2013.
- BATTISTI, A.J. *et al.* **Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein.** Proc. Natl. Acad. Sci., n. 109, p. 13996–14000, 2012.
- BECKER, S., J. QUAY, AND J. SOUKUP. **Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages.** J. Immunol., v. 147, p. 4307-4312, 1991.
- BENNETT BL *et al.* **Immunopathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis.** J Infect Dis., n. 195, v. 10, p. 1532–40, 2007.

BOHMWALD, KAREN, *et al.* **Neurologic alterations due to respiratory virus infections.** *Frontiers in cellular neuroscience.* v. 12, n. 386, 2018.

BORCHERS AT, CHANG C, GERSHWIN ME, GERSHWIN LJ. **Respiratory syncytial virus - A comprehensive review.** *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, v. 45, p. 331–79, 2013.

BRANITZKI-HEINEMANN, K. *et al.* **Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level.** *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 11, p. 1–9, 2016.

BRIKMANN V, ZYCHLINSKY. **Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?** *J Cell Biol.*, n. 198, v. 5, p. 773–783, 2012.

BRINKMANN V, *et al.* **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science*, n. 303, p. 1532–1535, 2004.

BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, *et al.* **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science.* n. 303, p. 1532–35, 2004.

BRINKMANN, VOLKER. **"Neutrophil extracellular traps in the second decade.** *Journal of innate immunity*, v. 10, p. 414-421, 2018.

BROWN, P. M.; SCHNEEBERGER, D. L.; PIEDIMONTE, G. **Biomarkers of respiratory syncytial virus (RSV) infection: Specific neutrophil and cytokine levels provide increased accuracy in predicting disease severity.** *Paediatric Respiratory Reviews*, v. 16, n. 4, p. 232–240, 2015.

BUCHANAN JT *et al.* **DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps.** *Curr Biol.*, v. 16, p. 396–400, 2006.

BÚFALO, M. C., *et al.* **In vitro cytotoxic activity of Baccharis dracunculifolia and propolis against HEp-2 cells.** *Natural Product Research*, v. 24, n. 18, p. 1710-1718, 2010.

C.C. WINTERBOURN, A.J. KETTLE **Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome Antioxid.** *Redox Signal*, v. 18, p. 642-660, 2013.

CANE, P. A. **Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus.** *Reviews in medical virology*, v. 11, n. 2, p. 103–16, 2001.

CHANOCK, R. *et al.* **Respiratory Syncytial Virus: Virus recover and other 75 observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children.** *JAMA*, v. 176, n. 8, p. 647– 653, 1961.

CHEMALY, R. F. *et al.* **Respiratory viral infections in adults with hematologic malignancies and human stem cell transplantation recipients: a retrospective study at a major cancer center.** *Medicine*, v. 85, n. 5, p. 278–287, 2006.

CLARK *et al.* **Respiratory syncytial virus infection: admissions to hospital in industrial, urban, and rural areas,** 1978.

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.

CORTJENS, BART, *et al.* **Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease.** The Journal of pathology, v. 238, n. 3, p. 401-411, 2016.

CRUZ, DAYANA BARBOSA DA, *et al.* **DNA-bound elastase of neutrophil extracellular traps degrades plasminogen, reduces plasmin formation, and decreases fibrinolysis: proof of concept in septic shock plasma.** The FASEB Journal, v. 33, n. 12, p. 14270-14280, 2019.

DINIZ, L. F. A. *et al.* **Effects of neutrophil extracellular traps during human respiratory syncytial virus infection in vitro.** Brazilian Journal of Biology, v. 83, 2021.

ENGLUND, J. A. *et al.* **Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults.** Annals of Internal Medicine, v. 109, n. 3, p. 203–208, 1988.

ESPINOZA, JANYRA A., *et al.* **Impaired learning resulting from respiratory syncytial virus infection.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 110, n. 22, p. 9112-9117, 2013.

FALSEY AR *et al.* **Respiratory syncytial virus infection in adults.** Clinical microbiology reviews, v. 13, n. 3, p. 371-384, 2000.

FALSEY AR *et al.* **Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults.** N Engl J Med., v. 352, n. 17, p. 1749–59, 2005.

FELTES TF, CABALKA AK, MEISSNER HC *et al.* **Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease.** J Pediatr., v. 143, p. 532–540, 2003.

FIGUEIREDO, LUIZ TADEU MORAES. **Pneumonias virais: aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento.** Jornal Brasileiro de pneumologia, v. 35, p. 899-906, 2009.

FOSTER, A. *et al.* **Dimerization of Matrix Protein Is Required for Budding of Respiratory Syncytial Virus.** J. Virol., v. 89, p. 4624–4635, 2015.

FUCHS TA, *et al.* **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** J Cell Biol., v. 176, n. 2, p. 231–41, 2007.

FUNCHAL *et al.* **Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils.** Plos one, v. 10, n. 4, 2015.

FURTMULLER, P. G.; *et al.* **Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases.** Biochem. Biophys., v. 445, n. 2, p. 199-213. 2006.

G. ZIMMER, L. BUDZ, G. HERRLER. **Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences.** J. Biol. Chem., v. 276, p. 31642-31650, 2001.

GALLI, S. J. *et al.* **Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils.** *Nature Immunol.*, v. 12, p. 1035–1044, 2011.

GAN, S.W. *et al.* **The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels.** *J. Biol. Chem.*, v. 287, p. 24671–24689, 2012.

GARCIA, J. *et al.* **Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: Formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein.** *Virology*, v. 195, p. 243–247, 1993.

GHILDYAL, R. *et al.*, **Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection.** *FEMS Microbiol.*, v. 30, p. 692–705, 2006.

GONZÁLEZ-REYES, LUIS *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 Sciences*, v. 98, n. 17, 2001.

HAEBERLE, H. A., R. TAKIZAWA, A. CASOLA, A. R. BRASIER, H. J. DIETERICH, N. VAN ROOIJEN, Z. GATALICA, AND R. P. GAROFALO. **Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor- κ B in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways.** *J. Infect.*, v. 186, p. 1199–1206, 2002.

HALL, C. B. **The nosocomial spread of respiratory syncytial viral infections.** *Annual review of medicine*, v. 34, n. 1, p. 311–319, 1983.

HALVERSON, TYLER *et al.* **DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps.** *Plos pathogens*, v. 11, n. 1, 2015.

HAN LY, WILSON R, SLATER S, RUTMAN A, READ RC, SNELL NJC, *et al.* **In vitro and in vivo effects of ribavirin on human respiratory epithelium.** *Thorax*, v. 45, n. 2, p. 100–4, 1990.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. **Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase.** *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 445, n. 2, p. 214–224, 2006.

HIROKI *et al.* **Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection.** *Frontiers in immunology*, v. 10, n. 3108, 2020.

HU, MENGJIE, *et al.* **Impact of respiratory syncytial virus infection on host functions: implications for antiviral strategies.** *Physiological Reviews*, v. 100, n. 4, p. 1527–1594, 2020.

J. C. POWERS, B. F. GUPTON, A. D. HARLEY, N. NISHINO, AND R. J. WHITLEY. **Specificity of porcine pancreatic elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G Inhibition with peptide chloromethyl ketones.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Enzymology*, v. 485, n. 1, p. 156–166, 1977.

J.G. BIETH R.P. MECHAM. **Regulation of Matrix Accumulation**. Academic Press, New York, p. 217, 1986.

J.S. MCLELLAN *et al.* **Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus**. Science, n. 342, p. 592-598, 2013.

J.S. MCLELLAN *et al.* **Structure of the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the post-fusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes**. J. Virol., 2011.

J.WALSH EE, HRUSKA J. **Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein**. J Virol., v. 47, n. 1, p. 171–7, 1983.

JANET, A., *et al.* **Respiratory Syncytial Virus Infection in Immunocompromised Adults**. Annu. Intern. Med., p. 203–208, 1988.

JANKOWSKI A, SCOTT CC, GRINSTEIN S. **Determinants of the phagosomal pH in neutrophils**. J. Biol. Chem., v. 277, p. 6059, 2002.

JENNE CN. *et al.* **Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps**. Cell Host Microbe, v. 13, n. 2, p. 169–80, 2013.

JENSEN C, JOHNSON FB. **Comparison of various transport media for viability maintenance of herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, and adenovirus**. Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 19, n. 3, 1994.

JHA, AKHILESH, *et al.* **Respiratory syncytial virus**. SARS, MERS and other viral lung infections, 2016.

K. OHLSSON, I. OLSSON. **The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases**. Eur. J. Biochem., v. 42, p. 519-527, 1974.

K.A. SWANSON *et al.* **Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers**. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 108, p. 9619-9624, 2011.

KARRON RA, *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.

KOCH, MARIANA SCHECHTEL, *et al.* **Aspectos gerais da Mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: Uma breve revisão**. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, 2021.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation**. Nature Reviews Immunology, Nature Publishing Group, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.

KONIG, H. *et al.* **Respiratory syncytial virus G-protein modulates cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells.** J. Leukoc. Biol., n. 59, p. 403–406, 1996.

KORKMAZ, BRICE, THIERRY MOREAU, AND FRANCIS GAUTHIER. **Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions.** Biochimie n. 90, v. 2, p. 227-242, 2008.

KURT-JONES, *et al.* **Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.** Nat. Immunol., n. 1, p. 398-401, 2000.

LAPPANN M, *et al.* **In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps.** Mol Microbiol., v. 89, n. 433, 2013.

LEPPKES, M., *et al.* **Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19.** EBioMedicine, v. 58, p. 102, 2020.

LEY, K., *et al.* **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** Nature Rev. Immunol., n. 7, p. 678–689, 2007.

LI, H.M. *et al.* **Respiratory syncytial virus matrix protein-chromatin association is key to transcriptional inhibition in infected cells.** Cells, n. 10, v. 2786, 2021.

LIEBERTHAL, ALLAN S., *et al.* **Diagnosis and management of bronchiolitis.** Pediatrics, v. 118, n. 4, p. 1774-1793, 2006.

LOPES, BRUNO RAFAEL PEREIRA *et al.* **Serine proteases in neutrophil extracellular traps exhibit anti-Respiratory Syncytial Virus activity.** International Immunopharmacology, 2022.

LUONG TT, LEE CY. **Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence.** Infect. Immun. v. 70, p. 3389–95, 2002.

M. BEGONA RUIZ-ARGUELLO *et al.* **Effect of proteolytic processing at two distinct sites on shape and aggregation of an anchorless fusion protein of human respiratory syncytial virus and fate of the intervening segment** Virology, n. 298, p. 317-326, 2002.

M.J. MCGUIRE, P.E. LIPSKY, D.L. THIELE **Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I** J. Biol. Chem., n. 268, p. 2458-2467, 1993.

MANTOVANI, A., *et al.* **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.** Nature Rev. Immunol. n. 11, p. 519–531, 2011.

MAYER, A. K., M. MUEHMER, J. MAGES, K. GUEINZIUS, C. HESS, K. HEEG, R. BALS, R. LANG, AND A. H. DALPKE. **Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells.**, 2007.

MCCORMICK A *et al.* **NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*.** *Microbes Infect.* v. 12, n. 12–13, p. 928–36, 2010.

MCKIMM-BRESCHKIN, JL. **A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus - Direct visualization of plaques without immunostaining.** *J Virol Methods.* v. 120, n. 1, p. 113–7, 2004.

MCNAMARA, P. S. *et al.* **Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis.** *Archives of Disease in Childhood,* v. 88, n. 10, p. 922–926, 2003.

MEJÍAS A, RAMILO O. **Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants.** *Biol Targets Ther.* v. 2, n. 3, p. 433–9, 2008.

MELERO, JOSÉ A., AND VICENTE MAS. **The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals.** *Virus research,* n. 209, p. 128-135, 2015.

METZLER *et al.* **A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis.** *Cell reports,* v. 8, n. 3, p. 883-896, 2014.

METZLER KD, *et al.* **Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity.** *Blood.* n. 117, v. 3, p. 953–9, 2011.

MIZGERD JOSEPH P. **Acute lower respiratory tract infection.** *New England Journal of Medicine,* v. 358, n. 7, p. 716-727, 2008.

MIZUTA, K. *et al.* **Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections on the basis of virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan.** *Jpn. J. Infect. Dis.,* n. 66, p. 140–145, 2013.

MODJARRAD K, *et al.*, **WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held.** *Vaccine.* v. 34, p. 190–7, 2016.

NAIR, H. *et al.* **Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis.** *The Lancet,* p. 1545-1555, 2010.

N. BORREGAARD. **Neutrophils, from marrow to microbes Immunity.** n. 33, p. 657-670, 2010.

NARASARAJU T, *et al.* **Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis.** *Am J Pathol.* V. 179, n. 1, p. 199–210, 2011.

NAUMENKO, V. *et al.* **Neutrophils in viral infection.** *Cell and Tissue Research,* 2018.

OGRA, P. L. **Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response.** Paediatr Respir., p. S119-S126, 2004.

OJWANG JO, ALI S, SMEE DF, MORREY JD, SHIMASAKI CD, SIDWELL RW. **Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family.** Antiviral Res., v. 68, n. 2, p. 49–55, 2005.

PANG I.K. IWASAKI A. **Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus.** Trends Immunol., n. 32, p. 34-41, 2011.

PAPAYANNOPOULOS V, *et al.* **Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps.** J Cell Biol. n. 191, v. 3, p. 677–691, 2010.

PARKER H, *et al.* **Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus.** J Leukoc Biol. n. 92, v. 4, p. 841–9, 2012.

PATEL, SANJAY R., ASHOK P. SUTHAR, AND RAJESH M. PATEL. **In Vitro Cytotoxicity activity of semecarpus anacardium extract against hep 2 cell line and vero cell line.** Int J PharmTech Res., 2009.

PEI, J. *et al.* **Nuclear-localized human respiratory syncytial virus NS1 protein modulates host gene transcription.** Cell Rep. v. 37, 2021.

PERSSON BD *et al.* **Respiratory syncytial virus can infect basal cells and alter human airway epithelial differentiation.** Plos One. N. 9, v. 7, 2014.

PETER L., AND GENEVIÈVE. **Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus.** Journal of general virology. n. 74, v. 7, 1993.

PETERS, A. M. **Just how big is the pulmonary granulocyte pool?** Clin. Sci. (Lond.), n. 94, p. 7–19, 1998.

PHILLIPSON, M. & KUBES, P. **The neutrophil in vascular inflammation.** Nature Med., v. 17, p. 1381–1390, 2011.

PILLAY, J. *et al.* **In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days.** Blood, n. 116, p. 625–627, 2010.

POLACK, F.P. *et al.* **The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n. 102, p. 8996–9001, 2005.

RADA, B. **Neutrophil Extracellular Traps.** NADPH Oxidases, p. 517–528, 2019.

R.DOTTA, L., TASSONE, L. AND BADOLATO, R. **Clinical and genetic features of warts, hypoglycemia, infections and myelokathexis (WHIM) syndrome.** Curr. Mol. Med., n. 11, p. 317–325, 2011.

RADEMECKER, C., *et al.* **Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19.** The Journal of experimental medicine, n. 217, v. 12, 2020.

RINCHEVAL, V., *et al.* **Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus.** J. Gen. Virol., n. 94, p. 1734–1738, 2013.

RUDD, B. D., M. A. SCHALLER, J. J. SMIT, S. L. KUNKEL, R. NEUPANE, L. KELLEY, A. A. BERLIN, AND N. W. LUKACS. **MyD88-mediated instructive signals in dendritic cells regulate pulmonary immune responses during respiratory virus infection.** J. Immunol., n. 178, p. 5820-5827, 2007.

RUGGERI, ROGER B., *et al.* **Discovery of 2-(6-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-4-oxo-2-thioxo-3, 4-dihydropyrimidin-1 (2 h)-yl) acetamide (pf-06282999): a highly selective mechanism-based myeloperoxidase inhibitor for the treatment of cardiovascular diseases.** Journal of medicinal chemistry, n. 58, v. 21, p. 8513-8528, 2015.

SADIK, C. D., *et al.* **Neutrophils cascading their way to inflammation.** Trends Immunol., n. 32, p. 452–460, 2011.

SAITOH T. *et al.* **Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1.** Cell Host Microbe, n. 12, v. 1, p. 109–16, 2012.

SEDEYN ID, *et al.* **Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2: Exceptional disrupters of innate immune responses.** Plos Pathog., n. 15, 2019.

SEGAL AW, GEISOW M, GARCIA R, HARPER A, MILLER R. **The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH.** Nature, n. 290, p. 406–9, 1981.

SHINGAI, M. *et al.* **Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction.** Int. Immunol., v. 20, p. 1169–1180, 2008.

SMEDLY LA, TONNESEN MG, SANDHAUS RA, HASLETT C, GUTHRIE LA, JOHNSTON RB JR, HENSON PM, WORTHEN GS. **Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase.** J Clin Invest., 1986.

SMITH, P. K., *et al.* **Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis.** Journal of paediatrics and child health, n. 37, v. 2, p. 146-151, 2001.

SOEHNLEIN, O. AND LINDBOM **Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.** Nature Rev. Immunol. n. 10, p. 427–439, 2010.

SOLLBERGER, G. *et al.* **Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps.** Science Immunology, v. 3, n. 26, 2018.

SOLTAN-DALLAL, MOHAMMAD MEHDI, *et al.* **Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEp-2 cell line by MTT assay.** Microbial pathogenesis, n. 113, p. 416-420, 2017.

SOUZA, PRISCILA SILVA SAMPAIO, *et al.* **Neutrophil extracellular traps possess anti-human respiratory syncytial virus activity: Possible interaction with the viral F protein.** Virus research, n. 251, 2018.

STEIN RL, TRAINOR DA. **Mechanism of inactivation of human leukocyte elastase by a chloromethyl ketone: kinetic and solvent isotope effect studies.** Biochemistry, 1986.

STEIN, ROSS L., AND ANNE M. STRIMPLER. **Slow-binding inhibition of chymotrypsin and cathepsin G by the peptide aldehyde chymostatin.** Biochemistry, n. 26, v. 9, p. 2611-2615, 1987.

SUMBY P, *et al.* **Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response.** Proc Natl Acad Sci., n. 102, p. 1679–1684, 2005.

SUMMERS, C. *et al.* **Neutrophil kinetics in health and disease.** Trends Immunol., n. 31, p. 318–324, 2010.

SWEETMAN, L.L., *et al.* **Neurologic Complications Associated With Respiratory Syncytial Virus.** Pediatr. Neurol., v. 32, p. 307–310, 2005.

SZTURMOWICZ, MONIKA, AND URSZULA DEMKOW **Neutrophil extracellular traps (NETs) in severe SARS-CoV-2 lung disease.** International journal of molecular sciences, n. 22, v. 16, 2021.

T. MOSMANN. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Methods, n. 65 v. 1–2, p. 55-63, 1983.

T.G BOYCE, *et al.* **Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus among children in Medicaid.** J Pediatr, n. 137, p. 865-870, 2000.

TAKEI H, *et al.* **Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis.** J Leukoc Biol., n. 59, p. 229–240, 1996.

TATSUTA, KUNIAKI, *et al.* **The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor.** The Journal of Antibiotics, n. 26, v. 11, p. 625-646, 1973.

TAWAR, R.G. *et al.* **Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus.** Science, n. 326, p. 1279–1283, 2009.

THORNHILL, E.M.; VERHOEVEN, D. **Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference.** Front. Cell. Infect. Microbiol., 2020.

TIWARI, PM. *et al.* **Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in HEp-2 cells.** J Microsc., n. 253, v. 1, p. 31–41, 2014.

TOFTS, P. S. *et al.* **Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days.** Blood, n. 117, 2011.

TULIC, M. K., R. J. HURRELBRINK, C. M. PRELE, I. A. LAING, J. W. UPHAM, P. LE SOUEF, P. D. SLY, AND P. G. HOLT. **TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide.** J. Immunol. n. 179, p. 132-140, 2007.

URBAN CF, ERMERT D, SCHMID M, ABU-ABED U, GOOSMANN C, *et al.* **Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*.** Plos Pathog, 2009.

URBAN CF, *et al.* **Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms.** Cell Microbiol., n. 8, v. 4, p. 668–676, 2006.

URBAN CF, *et al.* **Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*.** Plos Pathog, 2009.

VAN DEN BERG, J. MERLIJN, *et al.* **Divergent effects of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils.** Journal of leukocyte biology, n. 69, v. 3, p. 467-473, 2001.

VENTRE K, RANDOLPH AG. **Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children.** Cochrane Database, 2007.

VERAS, F. P. *et al.* **SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology.** The Journal of experimental medicine, n. 217, v. 12, 2020.

WEBER, *et al.* **Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries.** Tropical medicine & international health, n. 3, v. 4, p. 268-280, 1998.

W.L. LEE, G.P. DOWNEY **Leukocyte Elastase. Physiological functions and role in acute lung injury** Am. J. Respir. Crit. Care Med., n. 164, 2001.

WARDINI AB, *et al.* **Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus.** J Gen Virol. n. 91, p. 259–264, 2010.

WELLIVER RC. **Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection.** J Pediatr., n. 143, v. 5, p. 112–7, 2003.

WRIGHT, M.; PIEDIMONTE, G. **Respiratory syncytial virus prevention and therapy: Past, present, and future.** Pediatric Pulmonology, 2011.

YASUAKI ARATANI. **Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 640, p. 47-52, 2018.

Y AUJARD, B FAUROUX. **Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in infants.** Respir Med., v. 96, 2002.

ZAAIJER HL, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, FRANSSEN EJ. **Optimum dosage regimen of palivizumab?** Ther Drug Monit., n. 24, p. 444–445, 2002.

ZEIDLER, C. *et al.* **Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia.** Br. J. Haematol. n. 144, p. 459–467, 2009.

ZHENG W, *et al.* **PF-1355, a mechanism-based myeloperoxidase inhibitor, prevents immune complex vasculitis and anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis.** J Pharmacol., n. 353, v. 2, p. 288-98, 2015.