



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Campus de São José do Rio Preto

LARISSA FIGUEIREDO ALVES DINIZ

**PAPEL DAS ARMADILHAS EXTRACELULARES DOS
NEUTRÓFILOS (NETs) NO CURSO DA INFECÇÃO IN VITRO
PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV)**

São José do Rio Preto

2017

LARISSA FIGUEIREDO ALVES DINIZ

PAPEL DAS ARMADILHAS EXTRACELULARES DOS NEUTRÓFILOS (NETs)
NO CURSO DA INFECÇÃO IN VITRO PELO VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO (RSV)

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

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

São José do Rio Preto

2017

Diniz, Larissa Figueiredo Alves.

Papel das armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) no curso da infecção in vitro pelo Vírus Sincicial Respiratório (RSV) / Larissa Figueiredo Alves Diniz. -- São José do Rio Preto, 2017
132 f. : il.

Orientador: Karina Alves de Toledo

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

1. Microbiologia. 2. Vírus. 3. Virologia. 4. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 5. Agentes antivirais. 6. Neutrófilos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

LARISSA FIGUEIREDO ALVES DINIZ

PAPEL DAS ARMADILHAS EXTRACELULARES DOS NEUTRÓFILOS (NETs)
NO CURSO DA INFECÇÃO IN VITRO PELO VÍRUS SINCICIAL
RESPIRATÓRIO (RSV)

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Bárbara Nery Porto
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe
Universidade Federal de Juiz de Fora

São José do Rio Preto
01 de dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

O meu muito agradecimento à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Karina Alves de Toledo por todo o ensinamento acadêmico e além, por toda lição de vida, pelo apoio, preocupação, dedicação e por ter me proporcionado aprender e crescer durante essa caminhada.

À banca examinadora por terem aceitado o convite e pela contribuição ao trabalho.

Aos colegas de laboratório pelas trocas de conhecimento, a amizade e apoio que se fez presente dentro e fora do laboratório, pela ajuda sempre que possível, pela força dada quando necessária e pelo companheirismo, o que tornou toda essa trajetória muito mais fácil, alegre e divertida.

Aos colegas da UNESP Assis e UNESP Rio Preto pelo apoio, amizade, trocas de conhecimento, incentivo e pelos momentos de descontração, tornando os momentos mais leves.

À minha família, meus pais Silvia e Gilson, aos meus irmãos Ludmila, Igor, Everton e Eduardo Henrico, pelo suporte e apoio de toda uma vida, por acreditarem e me incentivarem e por estarem presentes em todos os momentos.

Às minhas amigas de graduação, Amanda, Izabella, Jéssica, Natália e Priscila, às quais considero como família, por sempre apoiarem, incentivarem, acreditarem e pela amizade de sempre que faz toda a diferença no caminhar da vida. Aos amigos, Ellen, Fabíola, Lucas e Maria Eduarda por estarem desde sempre comigo, apoiando, incentivando, torcendo e compartilhando experiências de vida.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esta dissertação fosse finalizada, com muito trabalho, amor, suor, momentos tranquilos e outros nem tanto, mas que o caminhar, do início ao fim foi de muito aprendizado, acadêmico e de vida.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia da UNESP Rio Preto, por me proporcionarem realizar o mestrado, à UNESP Assis pela infraestrutura usada para a realização da pesquisa, aos órgãos de fomento à pesquisa FAPESP e CAPES.

RESUMO

Neutrófilos são recrutados para o tecido pulmonar de pacientes acometidos por diversas doenças respiratórias. No sítio de infecção, neutrófilos secretam NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), fibras de DNA decoradas com proteínas nucleares, granulares e citoplasmáticas. As NETs contribuem para a captura e inativação de diversos microorganismos. Um corpo crescente de evidências tem apresentado que o acúmulo das NETs resulta em efeitos citotóxicos diretos sobre células endoteliais e epiteliais. O hRSV (*human Respiratory Syncytial Virus*), é a causa mais comum de doença grave do trato respiratório inferior em crianças pequenas em todo o mundo, gerando um alto número de hospitalizações e um alto custo para o sistema de saúde. Neutrófilos estimulados pela proteína F do hRSV geram NETs capazes de capturar partículas virais e assim reduzir a disseminação viral. A massiva produção de NETs causa obstrução das vias aéreas e contribui para o agravamento da doença. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos benéficos e/ou deletérios das NETs no curso da infecção pelo hRSV. Para tanto, células Hep-2 foram infectadas *in vitro* com diferentes inóculos de hRSV, antes ou depois de terem sido incubadas com as NETs (0.5-16 µg/mL). Células apenas infectadas apresentaram redução na taxa metabólica, intensa coloração com azul de trypan, formação de numerosos e volumosos sincícios. Comparativamente, o contato das células com as NETs, antes da infecção viral (MOI 0.1), resultou em melhora da taxa metabólica e da viabilidade celular, acompanhadas de redução no número e dimensão dos sincícios formados. O aumento do inóculo viral (MOIs 0.5 e 1) reduziu tais efeitos benéficos. Células já infectadas e, que foram pós-tratadas com as NETs, apresentaram sincícios mais volumosos, que numericamente estavam reduzidos. O aumento na concentração das NETs ($\geq 8\mu\text{g/mL}$) agravou a mortalidade celular, o que refletiu numa redução do número e da dimensão dos sincícios formados. Análises *in silico*, foram favoráveis à geração de complexos proteína F/MPO e proteína F/Catapsina-G, envolvendo sítios de neutralização viral. Em resumo, nas fases precoces da infecção, onde a concentração das NETs e a carga viral estão reduzidas, há um predomínio de efeito benéfico das NETs, que contribui na captura do virion e na proteção de células não infectadas.

A intensa geração das NETs em fases mais tardias da infecção, causa agravamento da morte celular. O detalhamento dos mecanismos envolvidos no equilibrado papel das NETs, na imunopatologia das doenças respiratórias, fornece subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que modulem a geração e a função das NETs no tecido pulmonar.

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

ABSTRACT

Neutrophils are recruited into the lung tissue of patients suffering from various respiratory diseases. At the site of infection, neutrophils secrete NETs (Neutrophil Extracellular Traps), DNA fibers decorated with nuclear, granular and cytoplasmic proteins. NETs contribute to the capture and inactivation of various microorganisms. A growing body of evidence has shown that the accumulation of NETs results in direct cytotoxic effects on endothelial and epithelial cells. Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the most common cause of severe lower respiratory tract disease in young children worldwide, leading to a high number of hospitalizations and a high cost to the health system. Neutrophils stimulated by hRSV F protein generate NETs capable of capturing viral particles and thus reduce viral spread. The massive production of NETs causes obstruction of the airways and contributes to the worsening of the disease. The present study aimed to evaluate the beneficial and/or deleterious effects of NETs in the course of hRSV infection. To this end, Hep-2 cells were in vitro infected with different hRSV load, either before or after incubation with the NETs (0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Infected cells had a reduction in the metabolic rate, intense staining with trypan blue, number formation and large syncytia. Cell contact with NETs prior to viral infection (MOI 0.1) resulted in improved metabolic rate and cell viability, accompanied by a reduction in the number and size of the syncytia. The increase of the viral inoculum (MOIs 0.5 and 1) reduced such beneficial effects. Already infected cells, which were post-treated with the NETs, presented larger syncytia, which were numerically reduced. The increase in NET concentration ($\geq 8\mu\text{g}/\text{mL}$) worsened cellular mortality, which reflected a reduction in the number and size of the syncytia. *In silico* analyzes, they favored the generation of F protein/MPO and F protein/Catapsin-G complexes, involving viral neutralization sites. In summary, in the early infection stages, where NETs concentration and viral load are low, there is a predominant beneficial effect of NETs, which contributes to virion capture and protection of uninfected cells. The intense generation of NETs in later infection stages causes worsening of cell death. Detailing the mechanisms involved in the balanced role of NETs in the immunopathology of respiratory

diseases provides support for the development of therapeutic strategies that modulate the generation and function of NETs in lung tissue.

Key-words: Neutrophil Extracellular Traps, Respiratory Syncytial Virus, Antivirals, Molecular Docking

Sumário

1. Introdução.....	12
1.1. Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV).....	12
1.1.1. Epidemiologia e Patogênese.....	12
1.1.2. Estrutura e Genoma.....	15
1.1.3. Proteína F	19
1.1.4. Profilaxia e Tratamento.....	21
1.2. Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs).....	24
1.2.1. NETs e o Vírus Sincicial Respiratório.....	24
1.2.2. Imunidade Inata e o hRSV.....	28
1.2.3. O papel Deletério dos Neutrófilos e das NETs.....	29
1.3. Docking Molecular.....	31
2. Objetivos.....	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
3. Materiais e Método.....	34
3.1. Declaração de Ética.....	34
3.2. Cultura Celular.....	34
3.3. Estoque Viral.....	34
3.4. Purificação de Neutrófilos Humanos.....	35
3.5. Estimulação de Neutrófilos Humanos para Geração das NETs.....	35
3.6. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase.....	36
3.7. Avaliação da Ação Anti-hRSV das NETs.....	36
3.7.1. Ensaio de Pré-Tratamento.....	37
3.7.2. Ensaio de Pós-Tratamento.....	37
3.8. Ensaio com azul de trypan.....	38
3.9. Ensaio Colorimétrico de Viabilidade por Adição do Sal de MTT.....	38
3.10. Cálculo da Área dos Sincícios.....	39
3.11. Análise.....	39
3.12. Análise Estatística.....	40
3.13. Análise de Bioinformática.....	40
3.13.1. <i>Screening por Docking molecular</i>	40

4. Resultados.....	41
4.1. Geração das NETS.....	41
4.2. Curso da Infecção por hRSV em Células Pré-Tratadas com NETs.....	41
4.3. Curso da Infecção por hRSV em Células Pós-Tratadas com NETs.....	43
4.4. Análises de Docking Molecular.....	51
5. Discussão.....	61
6. Conclusões.....	71
7. Referências.....	72
Anexo A.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus Sincicial Respiratório (hRSV)

1.1.1. Epidemiologia e Patogênese

As infecções do trato respiratório são as formas de infecção mais comuns que afetam o homem e, dentre essas, predominam as de causa viral (FIGUEIREDO, 2009). Ao redor do mundo, há cerca de 12 milhões de casos graves e 3 milhões de casos extremamente graves de infecção no trato respiratório inferior em crianças. O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) contribui com a infecção respiratória causando bronquiolite, pneumonia e infecção pulmonar obstrutiva crônica em pessoas de todas as idades, mas afeta principalmente crianças e idosos, e juntamente com outras infecções virais lidera o *ranking* de alta mortalidade e morbidade (BAWAGE et al., 2013).

O vírus sincicial respiratório (hRSV) foi primeiramente descrito em 1957 como causador de bronquiolite em crianças e é a causa mais comum identificada de infecção do trato respiratório inferior em crianças pequenas (até 5 anos) (HALL, 2001).

O hRSV é o líder dos patógenos respiratórios virais em lactantes e crianças pequenas no mundo todo (PARAMORE et al., 2004). Sendo o hRSV responsável por entre 160.000 a 600.000 mortes por ano (BAWAGE et al., 2013). A primeira infecção por hRSV ocorre durante o primeiro ano de vida em mais de 50% dos lactantes, e até os 2 anos de idade, quase todas crianças já foram infectadas pelo menos uma vez (CANE, 2001). A imunidade ao hRSV é incompleta (CHANOCK et al., 1961; FALSEY et al., 2005; GLEZEN et al., 1986; HALL, 2001; HALL; LONG; SCHNABEL, 2001; HENDERSON et al., 1979; OGRA, 2004; PAES et al., 2011; SIMOES, 1999; ZAMBON et al., 2001), por não gerar memória permanente (WALSH; PETERSON; FALSEY, 2004) e as reinfecções são comuns, podendo repetir-se ao longo da vida (KIM; CHANG, 2016).

Em adultos, achava-se que o hRSV causava principalmente infecções leves do trato respiratório superior (FALSEY; FORMICA; WALSH, 2002). Nas últimas décadas, porém, estudos mostraram que o hRSV causa infecção mais grave em idosos e em adultos com comprometimento imunológico e condições cardiopulmonares crônicas (CHEMALY et al., 2006; COUCH; ENGLUND;

WHIMBEY, 1997; ENGLUND et al., 1988; FALSEY et al., 2005; HALL; LONG; SCHNABEL, 2001; WALSH; FALSEY; HENNESSEY, 1999; WENDT; HERTZ, 1995; WHIMBEY et al., 1995; ZAMBON et al., 2001).

Aproximadamente, 25-40% dos lactentes e crianças na primeira exposição ao hRSV têm sinais ou sintomas de bronquiolite ou pneumonia. Os principais sintomas relatados em crianças infectadas por hRSV são rinorreia, febre baixa, prostração, tosse e respiração ofegante. Em adultos infectados são relatados faringite, rinorreia, fadiga, tosse, cefaleia, mal-estar e febre (FALSEY; WALSH, 2000, 2006; LEUNG; KELLNER; DAVIES, 2005). Também pode levar a sintomas exacerbados, como pneumonia grave em idosos, especialmente aqueles que residem em lares de idosos (asilos) (DENIS LH KASPER, E BRAUNWALD, AS FAUCI, SL HAUSER, DL LONGO, 2005). Geralmente, as crianças mostram sintomas dentro de 4 a 6 dias da infecção e a maioria delas se recuperam em 1 a 2 semanas enquanto servem como portadores do vírus por 1 a 3 semanas. A infecção hospitalar por hRSV em crianças está associada a maior mortalidade do que a doença adquirida na comunidade, por causa da comorbidade pre-existente, em particularmente pela presença de prematuros, principalmente os que possuem doença pulmonar crônica grave ou com ventilação mecânica devido a outras razões (LANGLEY et al., 1997; SIMON et al., 2008).

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

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

O hRSV tipo A (hRSVA) e tipo B (hRSVB) são os dois subtipos do hRSV que foram tipificados com base na reatividade antigênica aos anticorpos

monoclonais (ANDERSON et al., 1985) ambos com distribuição mundial e altamente contagiosos, sendo comum encontrar indivíduos infectados pelos dois subtipos simultaneamente. Vários estudos, no entanto, relacionam as formas mais graves de infecção respiratória aguda (IRA) ao subtipo A. As infecções por hRSV ocorrem o ano todo, entretanto, sua sazonalidade é maior e mais evidente em duas estações do ano, outono e inverno, quando costumam ocorrer os surtos epidêmicos e o maior número de casos graves que requerem hospitalização (FALSEY et al., 2005).

Estima-se que houve cerca de 66 mil a 199 mil mortes de crianças com menos de cinco anos de idade em todo o mundo no ano de 2005 em decorrência da infecção respiratória aguda (IRA) causada pelo hRSV (RESCH; MICHEL-BEHNKE, 2013). No Brasil, no ano de 2005, na cidade de São José do Rio Preto - SP, a prevalência de hRSV em crianças hospitalizadas por Infecções Agudas das Vias Aéreas Inferiores (IVAI) foi de 29,3% (JUNIOR et al., 2011), sendo o vírus responsável por 20,7% das infecções respiratórias virais em crianças que frequentam creche (BONFIM et al., 2011). Outro estudo no Brasil, na cidade de Belo Horizonte, mostrou que o hRSV foi o segundo vírus com maior número de amostras positivas e o mais frequente (65,6%) em crianças com menos de 5 anos (MONTEIRO; DEZANET; FRANÇA, 2016).

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

Geralmente, o hRSV penetra no corpo pelas mucosas das narinas, dos olhos ou boca, atinge a mucosa respiratória e infecta as células epiteliais da fossa nasal, iniciando sua replicação no epitélio nasofaríngeo onde induz a produção e secreção de uma série de citocinas (IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) que promovem o influxo leucocitário (DUDAS; KARRON, 1998; KURT-JONES et al.,

2000; RAJAN et al., 2013). Neutrófilos contribuem com a maior proporção de leucócitos nas vias aéreas de crianças infectadas com hRSV, representando de 73 a 90% das células inflamatórias (EVERARD et al., 1994). A intensa replicação viral culmina na formação de sincícios (massas multinucleadas formadas pela fusão de células) levando à disfunção e necrose tecidual (DUDAS; KARRON, 1998; KURT-JONES et al., 2000; RAJAN et al., 2013).

1.1.2. Estrutura e Genoma

O hRSV é membro do gênero *Orthopneumovirus*, família *Pneumoviridae*, pertencente à ordem *Mononegavirales* e espécie human orthopneumovirus, sendo o vírus denominado por vírus sincicial respiratório humano (hRSV) (RIMA et al., 2017). Geralmente são esféricos, apresentam bicamada lipídica, herdada da célula do hospedeiro durante o processo de replicação, e são vírus de tamanho variável. O hRSV possui um tamanho médio de 120 a 350 nm (TIWARI et al., 2014). Além disso, espécies filamentosas capazes de atingir vários micrômetros de comprimento também foram observadas. À exemplo das formas esféricas, os virions filamentosos são infecciosos (GOWER et al., 2005). O hRSV é caracterizado por ser um vírus envelopado com nucleocapsídeo helicoidal (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008), fita de RNA simples, linear, de polaridade negativa, não segmentado, com aproximadamente 15.2 kb, e 10 genes que codificam onze proteínas devido a sequência de leitura aberta no gene M2 (CHENG et al., 2005; FEARNES; COLLINS, 1999; HACKING; HULL, 2002).

Como dito anteriormente, o hRSV possui dois subtipos, A e B, com distribuição mundial e altamente contagiosos (FALSEY et al., 2005). Cada grupo pode ser subdividido em genótipos pela variabilidade na sequência de nucleotídeos.

Proteínas estruturais constituem a partícula viral do hRSV e proteínas não-estruturais, ausentes nos virions, são traduzidas durante a replicação viral. As proteínas não estruturais, NS1 e NS2 (inibidores do interferon tipo I), auxiliam na transcrição do genoma e são responsáveis pela evasão da resposta imune (COLLINS; GRAHAM, 2008; LO; BRAZAS; HOLTZMAN, 2005; ZHANG et al., 2005). Dentre as proteínas estruturais, cinco delas (N, P, L, M2-1 e M2-2) formam

o complexo nucleocapsídeo envolvido na replicação e transcrição viral, e quatro são proteínas de membrana (M, SH, G e F), sendo G e F glicoproteínas fundamentais para a infecção (adesão e fusão) do hRSV, com a célula hospedeira (BAWAGE et al., 2013; PETERS; CROWE, 2008) (Figura 1B).

NS1 e NS2, são proteínas pequenas (139 e 124 resíduos, respectivamente) e pouco conservadas. Ambas são proteínas acessórias, não essenciais, envolvidas na modulação da resposta imune (COLLINS; GRAHAM, 2008) por inibirem a produção de interferon (IFN), que é secretado pelas células eucarióticas como uma das primeiras linhas de defesa contra a infecção viral (BOSSERT; CONZELMANN, 2002; BOSSERT; MAROZIN; CONZELMANN, 2003; SCHLENDER et al., 2000; SPANN et al., 2004).

A proteína N permanece ligada ao RNA genômico viral durante a replicação e transcrição (COLLINS; CROWE 2007). Ela é a primeira dentre as proteínas estruturais a ser transcrita, originando o capsômero. O agrupamento do capsômero ao redor do genoma forma o capsídeo viral, e este, associado ao genoma forma o nucleocapsídeo, um complexo de simetria helicoidal que confere estabilidade e resistência à partícula viral (COLLINS; GRAHAM, 2008). Provavelmente, a presença do nucleocapsídeo reduz a detecção dos RNAs virais pelos receptores do tipo toll (TLRs) na célula hospedeira e a ativação da resposta imune inata pela citocina interferon tipo I (IFN) e pelo fator de transcrição NF- κ B (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; LIU et al., 2007). Sabe-se que o RSV induz a secreção de IFN- β pelas células epiteliais das vias respiratórias (JAMALUDDIN et al., 2001; SPANN et al., 2004; SPANN; TRAN; COLLINS, 2005).

A grande proteína L é a principal subunidade da polimerase e contém domínios catalíticos (COLLINS; GRAHAM, 2008). Possui seis regiões conservadas entre a família dos vírus de RNA com polaridade negativa, fita simples e não segmentados, o que a torna um alvo promissor para as pesquisas de compostos com atividade antiviral (TIONG-YIP et al., 2014). A proteína L atua como uma RNA-polimerase-RNA-dependente, auxilia na formação da estrutura do *cap* (capsídeo) e age no processo de poliadenilação (MORIN et al., 2013; STEC; HILL; COLLINS, 1991).

A fosfoproteína P é um cofator essencial à síntese do RNA (DUPUY et al., 1999). Ela atua como uma chaperona, auxiliando outras proteínas virais a

atingirem sua conformação terciária correta, além de aumentar a especificidade de encapsulamento do RNA viral, impedindo que a proteína N se ligue aos RNAs celulares (SPEHNER; DRILLIEN; HOWLEY, 1997). Acredita-se que a proteína P possa se associar com as proteínas N e L para mantê-las na forma solúvel durante a montagem e interação com os nucleocapsídeos (COLLINS; GRAHAM, 2008).

As proteínas M2-1 e M2-2 são fatores envolvidos, respectivamente, na transcrição (FEARNS; COLLINS, 1999) e no equilíbrio entre transcrição e replicação do RNA (BERMINGHAM; COLLINS, 1999). M2-2 atua em conjunto com as proteínas não estruturais (NS1 e NS2), principalmente nos estágios finais da infecção, auxiliando na etapa de montagem do vírion (CHENG et al., 2005).

Quatro outras proteínas do hRSV (M, G, F e SH) associam-se com a bicamada lipídica para formar o envelope viral (COLLINS; CROWE 2007). Este é constituído principalmente pela proteína M que, nos estágios iniciais da infecção, pode atuar inibindo a transcrição das moléculas da célula hospedeira, priorizando a transcrição das moléculas virais. A proteína M também desempenha papel crucial no brotamento da partícula viral, facilitando a montagem e inibindo a atividade transcricional do nucleocapsídeo antes da encapsulação através da interação com o complexo ribonucleoprotéico (RNP) (GHILDYAL et al., 2002; LENARD, 1996).

A pesada glicoproteína G, a proteína F de fusão e a pequena proteína hidrofóbica SH são proteínas transmembranas de superfície (Figura. 1 A) (COLLINS; CROWE 2007).

A glicoproteína G exerce um papel importante, mas não exclusivo, na adsorção viral (TENG; WHITEHEAD; COLLINS, 2001). Estudos indicam que esta ligação ocorra através de interações com heparina sulfatada e com os receptores (CX3CR1 e TLR4), modulando a resposta imune e dando então início à etapa de internalização (KURT-JONES et al., 2000; MCLELLAN; RAY; PEEPLES, 2013).

A proteína F é responsável pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, liberando o nucleocapsídeo no citosol (COLLINS; MOTTET, 1993). Ela também medeia a fusão das membranas das células infectadas com as células vizinhas promovendo a formação do sincício (GONZÁLEZ-REYES et

al., 2001). A sua função essencial para a infecção viral à torna a mais estudada dentre as proteínas do hRSV (COLLINS; MOTTET, 1993).

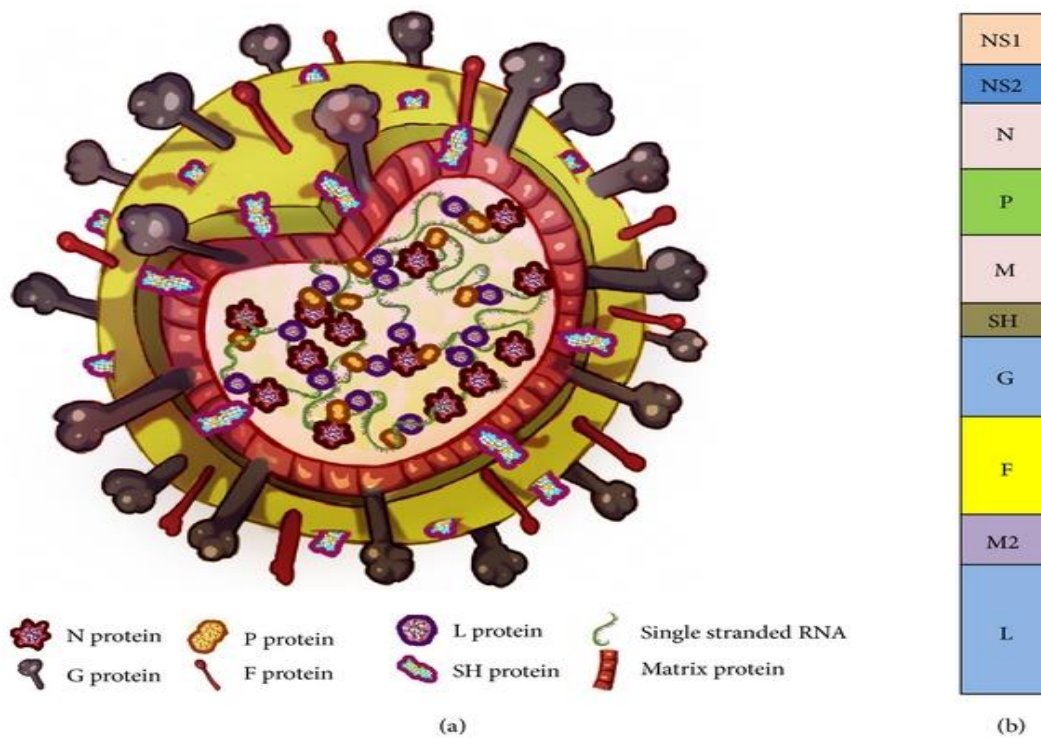


Figura 1. (A) Organização e estrutura do genoma do hRSV. (B) Genoma de RNA cadeia simples sentido negativo constituído por 10 genes (BAWAGE et al., 2013).

Embora o mecanismo detalhado de infecção do hRSV não seja totalmente compreendido, o mecanismo mais aceite é de que o hRSV penetra na célula hospedeira através da fusão direta do seu envelope com a membrana plasmática da célula alvo, mediado pela proteína F. Primeiramente o RNA é convertido em mais uma cadeia, que serve como molde para a replicação, enquanto que para a transcrição, o próprio genoma do RNA transcreve o mRNA para sintetizar as proteínas sem qualquer intermediário (Figura 2) (BAWAGE et al., 2013).

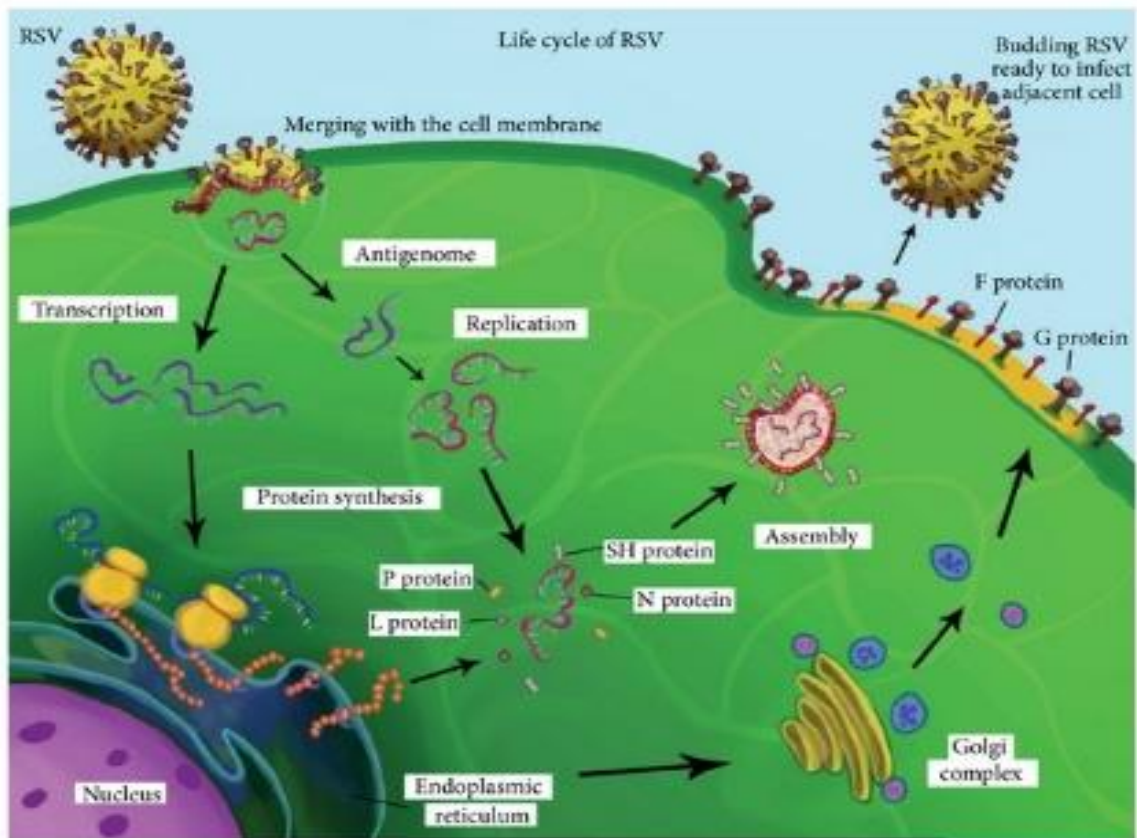


Figura 2. Representação esquemática do ciclo viral. Adaptado de BAWAGE et al, 2013.

A proteína F acumula-se na membrana do hospedeiro que depois envolve a progênie dos vírus no brotamento, espalhando assim a infecção para células adjacentes e exacerbando a infecção (Figura 2). Dada a importância da proteína F na replicação e disseminação do hRSV, ela é rotineiramente uma candidata alvo no desenvolvimento de medidas de prevenção tais como anticorpos, vacinas de DNA e vacinas de subunidades (BAWAGE et al., 2013).

1.1.3. Proteína F

É caracterizada por ser uma glicoproteína do tipo I, por ser de envelope e por possuir *coiled-coils* como as demais proteínas de fusão de outros vírus. É formada por três unidades monoméricas idênticas, sendo portanto um homotrímero (LUQUE; RUSSELL, 2007; RUSSELL; JARDETZKY; LAMB, 2001). Além de mediar a fusão do envelope viral à membrana citoplásmica, permitindo assim a infecção, é responsável pela fusão de células infectadas com células adjacentes, levando à formação de

sincícios, células gigantes multinucleadas que é característica morfológica da presença do hRSV replicante num determinado tecido (COLLINS et al., 2001).

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

A proteína F (Figura 3) do hRSV é uma glicoproteína tipo I, sintetizada como um precursor, F₀ [de 67 –kDa (COLLINS; MCINTOSH; CHANOCK, 1996)], as unidades monoméricas são montadas em um trímero no retículo endoplasmático (GONZÁLEZ-REYES et al., 2001; ZIMMER; BUDZ; HERRLER, 2001). Cada monômero é clivado por proteases intracelulares do hospedeiro, semelhante as furinas, produzindo assim duas subunidades: F₁ e F₂ (COLLINS; GRAHAM, 2008). A região de fusão do peptídeo, um segmento hidrofóbico/rico em glicina que se insere no alvo da membrana celular durante o processo de fusão, está localizado na região N terminal da subunidade F₁ (COLLINS; MCINTOSH; CHANOCK, 1996). O segmento transmembrana está localizado na região C terminal da subunidade F₁. F₂ e F₁ permanecem ligadas por uma ponte dissulfeto e representam a forma ativa (COLLINS; GRAHAM, 2008).

Uma vez clivada, a proteína F do hRSV é totalmente ativada. Aparece na superfície celular, onde causa fusão virion-célula, uma etapa essencial que inicia a infecção. O trímero da proteína F na superfície dos paramyxovirus está na forma de pré-fusão “metaestável” (LUQUE; RUSSELL, 2007; RUSSELL; JARDETZKY; LAMB, 2001). Após se ligar à moléculas receptoras expressas na superfície celular, passa por mudanças conformacionais para um estado de pós-fusão (BAREL et al., 2008). Seu feixe de 6 hélices aproxima a membrana plasmática da célula alvo à membrana viral, resultando em fusão das mesmas (COSTELLO et al., 2012). Assim, existe três estados conformacionais para a proteína F: um estado nativo antes da fusão, formado antes da clivagem; um estado intermediário em “*pre-hairpin*”, formado após a clivagem proteolítica, e o estado pós-fusão, em que duas regiões “*heptad-repeat*” formam um conjunto de seis alfa-hélices (ZHU et al., 2003) (Figura 4).

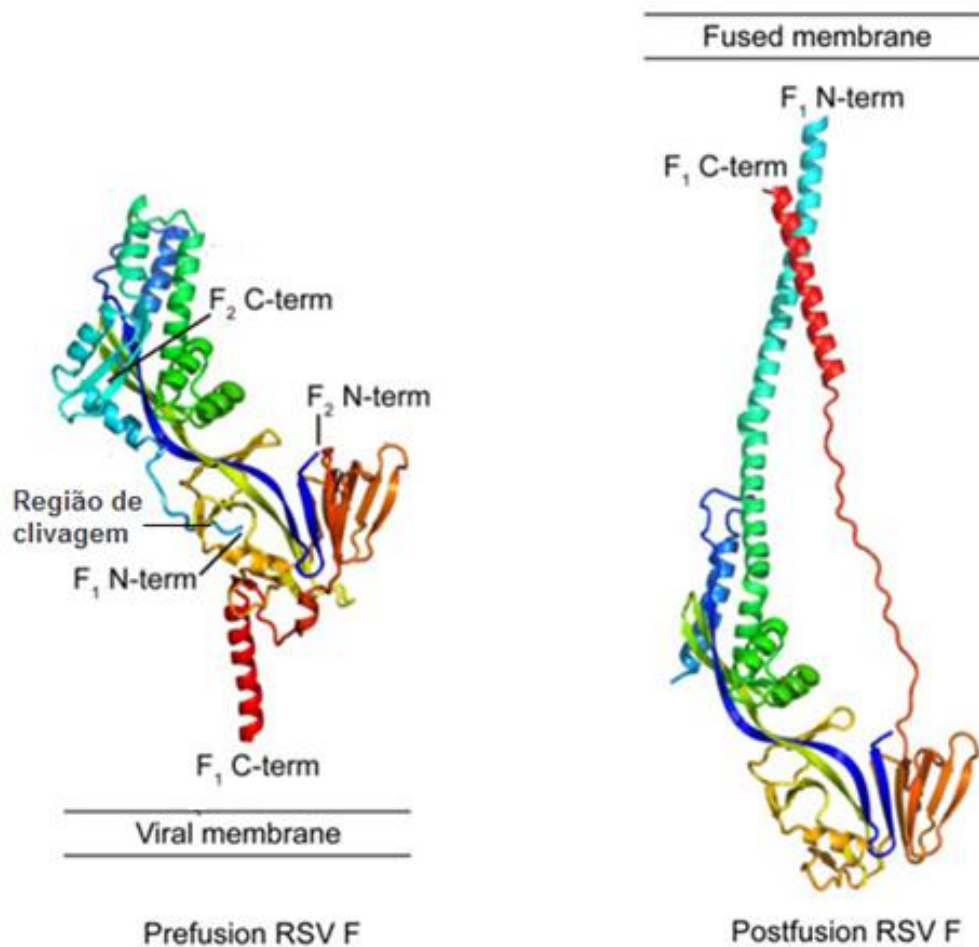


Figura 3. Estrutura monomérica da proteína F na conformação pré e pós-fusão. Regiões terminais de F₁ e F₂ estão destacadas na imagem (Adaptada de McLellan et al., 2013).

1.1.4. Profilaxia e Tratamento

Apesar do impacto significativo da infecção por hRSV no mundo, não existe nenhuma vacina disponível atualmente, e nosso conhecimento da imunopatogênese da doença continua limitado (MEJÍAS et al., 2005).

Sendo assim, não existe tratamento específico para doenças causadas pelo hRSV, por conseguinte, medidas de alívio dos sintomas, de suporte ventilatório e de manutenção do estado geral são indicadas quando necessárias (YU et al., 2006).

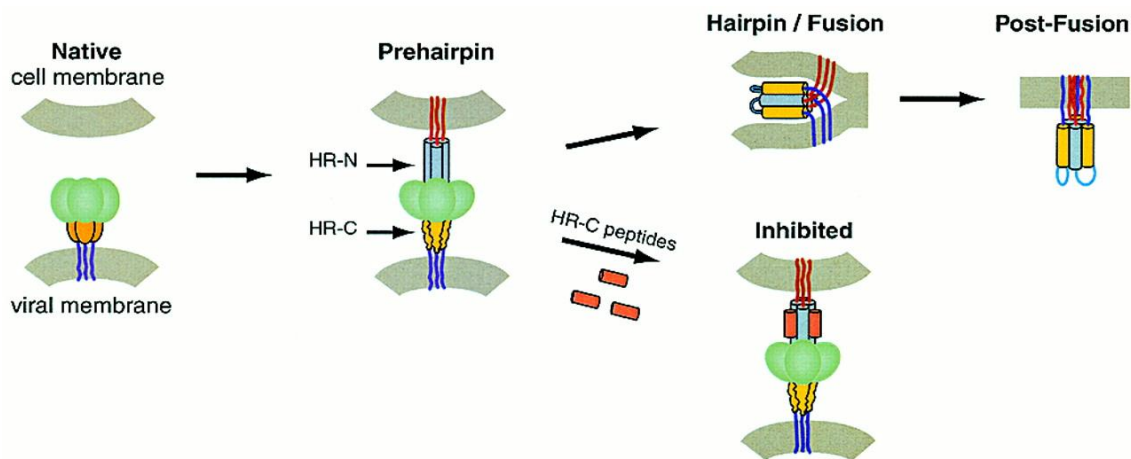


Figura 4. Modelo de fusão das membranas vírus-célula. O modelo demonstrado é baseado em estudos da gp41 mediando o processo de fusão das membranas na infecção por HIV-1. A proteína F do hRSV sofre mudanças conformacionais semelhantes. No estado nativo, o peptídeo de fusão (não mostrado) é inacessível. Depois da ativação, a proteína de fusão sofre mudança conformacional, para um estágio intermediário pre- hairpin, onde o peptídeo de fusão (linhas vermelhas) é inserido no alvo da membrana celular, e a região do peptídeo HR-N (azul claro) é um coiled coil trimérico. A região do peptídeo HR-C (amarelo) não foi associada ainda com o peptídeo coiled coil N. Este intermediário é vulnerável à inibição pelo peptídeo HR-C (peptídeos inibitórios mostrados em laranja). O intermediário pre hairpin transforma-se em estrutura de fusão hairpin ativa quando a região do peptídeo HR-C liga-se ao peptídeo coiled coil HR-N e adota a conformação helical. Este rearranjo resulta em aposição da membrana. Figura adaptada de Chan e Kim, 1998.

A prevenção é o aspecto mais importante dos cuidados de saúde e tem principal contribuição para a culminação da doença, mais do que as medidas de tratamento. Medidas preventivas eficazes reduzem a mortalidade e a sobrecarga econômica da doença. O contato direto ou indireto com secreções ou gotículas nasofaríngeas (espirros, tosse e beijo), fômites e alimentos de pacientes infectados podem potencialmente transmitir hRSV. O vírus vivo pode sobreviver em superfícies por várias horas (HALL; DOUGLAS, 1981).

O tratamento atual recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration) consiste na administração conjunta de Palivizumab (um anticorpo monoclonal que tem como alvo a proteína de fusão F do hRSV), Ribavirina (um nucleósido análogo) e outras drogas que combatem os principais sintomas da doença. Entretanto a eficácia desse tratamento depende do diagnóstico precoce da infecção por hRSV, o que geralmente não é possível devido à similaridade sintomática com outras infecções (YU et al., 2006). A administração individual de

Palivizumab ou Ribavirina é indicada nos casos de prevenção e tratamento, respectivamente (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017).

A Ribavirina, um nucleosídeo análogo que inibe a síntese de ácido nucleico viral (Ventre e Randolph, 2007), é atualmente o único fármaco licenciado existente para tratar de infecções por hRSV (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017). No entanto, este tratamento possui risco mutagênico para os pacientes, sendo indicado praticamente apenas para adultos imunocomprometidos (VENTRE; RANDOLPH, 2007). Numerosos ensaios cegos de pacientes infectados por hRSV demonstraram uma rápida depuração do hRSV, diminuição do derramamento viral, e curta hospitalização com o uso de Ribavirina (CONRAD et al., 1987; D.W. et al., 1991; HALL et al., 1983). Entretanto, o seu custo é bastante alto e já existem relatos de mutantes virais resistentes a sua ação, o que tem feito o seu uso cada vez menor (WELLIVER, 2010).

O palivizumab (Synagis) é um anticorpo monoclonal do tipo IgG1, humanizado a partir de ratos, produzido por tecnologia de DNA recombinante. É composto por 95% de sequências de aminoácidos humano e 5% murinho (JOHNSON et al., 1997; WU et al., 2008). É um anticorpo monoclonal humanizado que age diretamente contra a proteína de fusão F do hRSV expressa na superfície do virion (SUBRAMANIAN et al., 1998). O Motavizumab (Numax) é um anticorpo monoclonal derivado do Palivizumab, produzido e otimizado através da técnica de maturação de afinidade *in vitro*, processo que eleva a taxa mutacional em determinadas partes do DNA, levando a uma seleção clonal e aumento da afinidade pelo antígeno. Difere do Palivizumab em 13 aminoácidos, tendo sido aprovado pelo FDA em 2008 para uso em humanos (WU et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstram que Palivizumab e Motavizumab neutralizam a replicação do hRSV em cultura celular quando o vírus é pré-tratado com este anticorpo. Ambos os anticorpos têm como alvo um epítipo no sítio II, localizado entre os aminoácidos 258-275 (também denominado sítio A) altamente conservado, neutralizando e inibindo sua atividade de fusão (HUANG et al., 2010).

A profilaxia com o anticorpo monoclonal humanizado palivizumab (Synagis®), administrado por uma série de injeções durante a estação da

doença, mostrou benefício na prevenção de infecções por RSV (JOHNSON et al., 1997; RUSSEL, 1999). No entanto o custo dessa medida é muito elevado e vem sendo usado apenas na imunização de crianças de alto risco. A eficácia desses tratamentos também dependem do diagnóstico precoce da infecção por hRSV, o que geralmente não é possível devido à similaridade sintomática com outras infecções, e o custo elevado do tratamento e seu risco mutagênico desencoraja seu uso (YU et al., 2006).

Tratamentos menos específicos, como o uso de medicamentos broncodilatadores e corticosteroides em pacientes infectados por hRSV, se mostraram ineficientes em diminuir a taxa de hospitalização e mortalidade (CORNELI et al., 2007; DOBSON et al., 1998; FLORES; HORWITZ, 1997).

Em resumo, são necessários fármacos mais seguros, em doses terapêuticas reduzidas, que assegurem seu uso difundido na prevenção e no tratamento de infecções por hRSV.

Portanto, se faz necessária a continuidade dos estudos que buscam um maior conhecimento sobre a patogênese da doença, bem como pela busca por uma vacina eficaz contra as duas cepas de hRSV (A e B). O benefício direto seria, principalmente, para idosos, crianças e recém-nascidos em virtude do alto índice de reinfecção para estes pacientes. Além disso, por se tratar de espaços com um grande fluxo de indivíduos suscetíveis a tais infecções, escolas primárias, creches e hospitais são locais estratégicos para o desenvolvimento e uso de novos medicamentos que sejam seguros e eficazes.

1.2. Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

1.2.1. NETs e o Vírus Sincicial Respiratório

Os neutrófilos são células de curta duração, geralmente duram cerca de 6-20h em circulação em condições saudáveis. Durante infecções, no entanto, sua vida útil é prolongada durante e após o processo migratório. Este fato possibilita que o neutrófilo amplie seu tempo de atuação microbicida, auxilie no recrutamento de um maior número de células e previne a disseminação do patógeno. Várias citocinas, tais como o interferon- γ (IFN - γ), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de estimulação de colônias granulocíticas (G-CSF) foram

mostrados como prolongadores da sobrevivência dos neutrófilos durante o recrutamento para o local da infecção. O vírus sincicial respiratório (RSV) é capaz de prolongar a sobrevivência de neutrófilos, presumivelmente através das vias dependentes PI3K- e NF- κ B (DRESCHER; BAI, 2013).

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

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

Em 2004, foi descrito um novo mecanismo de eliminação de patógenos pelos neutrófilos no qual envolve a formação de estruturas denominadas *neutrophil extracellular traps (NETs)* (BRINKMANN et al., 2004) (Figura 5). As NETs são estruturas extracelulares que têm DNA como principal componente estrutural e contém enzimas presentes nos grânulos dos neutrófilos (como elastase, mieloperoxidase, proteinase 3, catepsina G, e outras), histonas e outros componentes nucleares (FUCHS et al., 2007; URBAN et al., 2009). Neutrófilos sob estímulos de diferentes origens [IL-8, lipopolissacarídeos (LPS), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), bactérias, fungos ou plaquetas ativadas] iniciam um mecanismo programado que os levará à morte e à formação das NETs. Sabe-se que o neutrófilo pode liberar as NETs por outro mecanismo, onde este continua viável, sendo denominado netose vital, no qual os neutrófilos liberam as NETs rapidamente [por estímulos microbiais reconhecidos pelo hospedeiro (YIPP et al., 2014) depois de 5-15 minutos de ativação, sem afetar a viabilidade dos neutrófilos (PILSCZEK et al., 2010)]. *In vivo* a formação das NETs é

dependente da enzima PAD4, responsável pela citrulinização das histonas, com consequente descondensação do DNA (WANG et al., 2009).

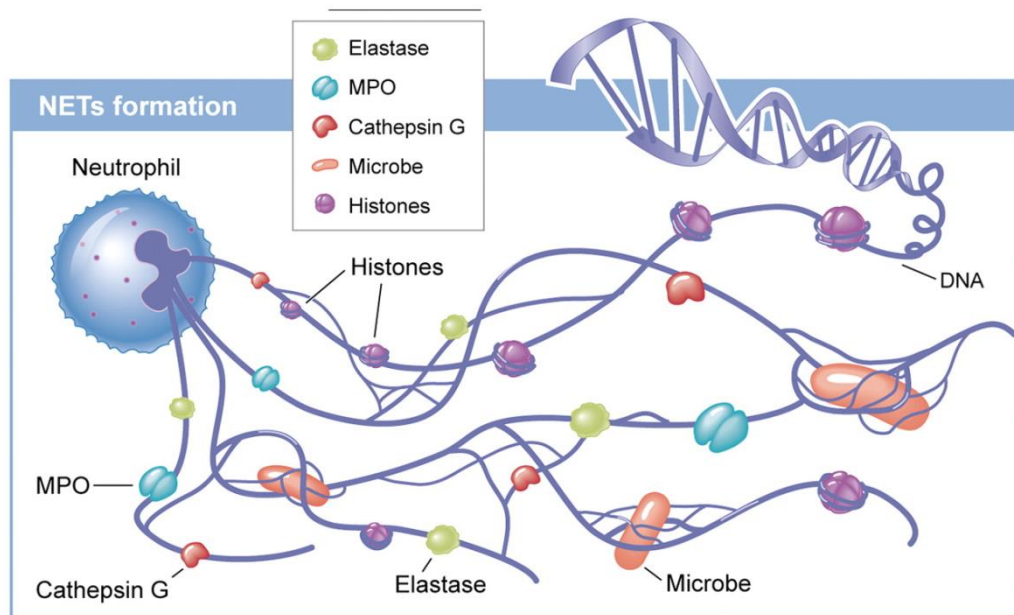


Figura 5. Esquema demonstrando algumas das principais estruturas presentes nas NETs. (Adaptada de Miyata e Fan, 2012)

Este processo de morte celular, batizado como NETose, é diferente dos processos de apoptose e necrose, dependentes ou não da geração de ROS. Além disso, as características morfológicas descritas não requerem ativação de caspases e não são acompanhadas de fragmentação do DNA diferenciando-se da necrose, bem como não há exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática, diferenciando-se da apoptose (BRINKMANN et al., 2004; FUCHS et al., 2007; GUIMARÃES-COSTA et al., 2009).

O processo de NETose é um processo ativo que envolve o rearranjo da arquitetura nuclear, citoplasmática e granular do neutrófilo (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007). Durante este processo ocorre perda das membranas intracelulares e mistura dos componentes nucleares e citoplasmático seguida de desintegração da membrana plasmática e liberação das NETs (VOROBEVA; PINEGIN, 2014).

Neutrófilos são rapidamente recrutados para sítios de infecção viral, mas seu impacto durante tais processos ainda é confuso. Em alguns estudos, utilizando vírus da *Influenza*, neutrófilos demonstraram ser essenciais para limitar a replicação viral, enquanto que em outros estudos, sua presença resultou

em aumento da morte celular epitelial (DRESCHER; BAI, 2013; PANG; IWASAKI, 2011; THOMAS et al., 2009). Até o momento, a interação de neutrófilos com os vírus é bem menos caracterizada do que aquelas envolvendo bactérias ou fungos, especialmente no que diz respeito à geração das NETs.

Embora escassos, trabalhos demonstram a produção de NETs por alguns vírus, incluindo o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (WARDINI et al., 2010) e o Vírus da Imunodeficiência do tipo-1, HIV-1 (SAITOH et al., 2012a). Saitoh et al, demonstraram ainda que as partículas virais do HIV-1 são capturadas pelas NETs, resultando em inativação do vírus e diminuindo sua disseminação. As análises de imunofluorescência revelaram uma abundante presença de MPO e α -defensina nas NETs induzidas pelo HIV-1. A inibição destas proteínas resultou em uma resposta virucida reduzida das NETs em relação ao HIV-1, indicando que as NETs asseguram altas concentrações locais de MPO e α -defensina para inativar o HIV-1 (SAITOH et al., 2012a).

Estudos tanto em *in vivo* como em *in vitro* demonstraram que as estruturas de rede da NET podem ligar-se e sequestrar virions, evitando que atinjam suas células alvo (JENNE et al., 2013; SAITOH et al., 2012a). Nesses estudos a capacidade de ligação dos virions foi diretamente atribuída a estrutura de DNA da NET e foi comprometida seguindo o tratamento das NETs com DNase (MOORTHY et al., 2013; SAITOH et al., 2012a; SHORT et al., 2014). NETs tem sido demonstrado por neutralizar as partículas virais, envolvendo MPO e defensinas, as quais são grânulos de proteínas associadas com as NET. A ação vai além de simplesmente sequestrar o vírus nas NETs, já que os virions recuperados das NETs tem a sua capacidade de infectar as células alvo reduzidas (SAITOH et al., 2012a). Tratamento tanto com inibidor de mieloperoxidase ou anticorpo antidefensina reduz a capacidade das NETs de neutralizar os virions de HIV-1 (SAITOH et al., 2012a).

Recentemente foi demonstrada a capacidade do vírus hRSV de induzir a liberação de NETs por neutrófilos humanos, sendo a proteína F do vírus a responsável por estimular esta liberação. A glicoproteína de fusão F do hRSV foi um estímulo capaz de induzir NETs assim como os estímulos por PMA e LPS (estímulos indutores de NETs). Foi demonstrado também que tais NETs apresentavam DNA como componente principal, além de mieloperoxidase e elastase neutrofílica (FUNCHAL et al., 2015).

Contudo, há muito ainda a ser estudado a respeito do papel dos neutrófilos frente a infecção viral, bem como da relação das NETs com os vírus, especialmente o hRSV que pouco sabe-se a respeito.

1.2.2. Imunidade Inata e o hRSV

Durante a infecção por hRSV há o envolvimento de células epiteliais, células do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo (BUENO et al., 2008). As células epiteliais é o alvo inicial da infecção pelo vírus hRSV. O hRSV induz a expressão de TLR3 e proteína quinase R nas células epiteliais levando ao aumento da responsividade das células epiteliais frente à infecção e levando a ativação da resposta imune inata (GROSKREUTZ et al., 2006).

Além disso as células epiteliais das vias aéreas, quando infectadas *in vitro* com hRSV, produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação e o recrutamento do sangue para o tecido infectado de diferentes células do sistema imune, como neutrófilos (através da IL-8 produzida no tecido), monócitos (através de MCP-1, ou seja, proteína quimiotática de monócitos 1), células T de memória (através de RANTES ou CCL5) e eosinófilos (através de eotaxina) (OLSZEWSKA-PAZDRAK et al., 1998). Emboriadou e colaboradores demonstraram que há um nível elevado de elastase neutrofílica (enzima presente nos grânulos dos neutrófilos) no trato respiratório superior em pacientes com bronquiolite causada por hRSV (EMBORIADOU et al., 2007). Outro estudo demonstrou que o hRSV aumenta a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) em células endoteliais durante uma infecção *in vitro*, a adesividade celular aumentada resulta numa transmigração elevada de neutrófilos para o local (ARNOLD; KONIG, 2005; RZEPKA; HAICK; MIURA, 2012).

Neutrófilos humanos incubados com hRSV produzem IL-8, MIP-1 α e MIP-1 β e liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) a partir de seus grânulos (JAOVISIDHA et al., 1999). Reconhece-se agora que o processo inflamatório nas vias aéreas de lactentes com bronquiolite por hRSV é dominado por um intenso influxo de neutrófilos tanto nas vias respiratórias inferiores quanto superiores (EVERARD et al., 1994; SMITH et al., 2001) que os produtos, tais

como mieloperoxidase e elastase dos neutrófilos são liberados nas vias respiratórias (ABU-HARB et al., 1999). Ainda não é claro se estas células participam na eliminação do vírus, embora estudos experimentais demonstraram que os neutrófilos danificam as células epiteliais respiratórias infectadas pelo hRSV (WANG et al., 1998).

1.2.3. O Papel Deletério dos Neutrófilos e das NETs

Em estudos com cepas altamente patogênicas de influenza, neutrófilos demonstraram-se serem críticos na limitação da replicação viral e durante a progressão da doença nas fases iniciais da infecção (TATE et al., 2009; TUMPEY et al., 2005). Contudo, outros estudos reportaram que o recrutamento de neutrófilos ao pulmão em resposta a infecção viral, está associado com o aumento de morte celular epitelial, deposição de fibrina, e uma piora no prognóstico (DRESCHER; BAI, 2013; PANG; IWASAKI, 2011; THOMAS et al., 2009). Um pouco da confusão em relação ao papel que os neutrófilos desempenham durante a infecção viral pode ser atribuída a um entendimento incompleto em relação ao mecanismo efetor ao qual os neutrófilos se utilizam para lidar com os vírus.

Moléculas derivadas de vírus, atuam como padrões moleculares associado à patógenos (PAMPs), sendo potentes indutores da produção de NET. Em contrapartida, nenhum sinal específico foi identificado para a liberação das NETs, porém essa resposta tem sido atribuída a uma variada gama de estímulos incluindo ligantes de receptores de toll like (TLR), esterases forobóis, fatores do complemento, e a ligação de plaquetas ativadas aos neutrófilos. Um grande número de vírus induz a formação de NET, incluindo Influenza A, HIV-1, mixoma, vírus da encefalomiocardia (KOUPENOVA et al., 2014; NARASARAJU et al., 2011) e o hRSV (FUNCHAL et al., 2015).

NETs são extremamente citotóxicas. Essas estruturas viscosas estão repletas de moléculas designadas para combater agentes patogênicos, contudo, essas redes falham em diferenciar patógenos de não patógenos. Muitos dos componentes individuais da NET, incluindo elastase e histonas, são citotóxicas às células, levando ao dano endotelial, exposição do subendotélio, coagulação

e exacerbação da inflamação (BRILL et al., 2012; CLARK et al., 2007; FUCHS et al., 2010; XU et al., 2009). A própria natureza da estrutura das NETs aumenta sua citotoxicidade. Essa rede impede a difusão das proteínas granulares dos neutrófilos dentro do ambiente extracelular, concentrando as moléculas antimicrobiais (citotóxicas), e através da “adesividade” das fitas de DNA, acaba aderindo esta estrutura, potencialmente prejudicial, à superfície das células hospedeiras. O resultado final é potencialmente significativo de danos colaterais.

Neutrófilos excessivos e deposição da NET tem sido reportados em infecções de influenza severa. Análises imunohistoquímicas dos pulmões de ratos infectados demonstraram pronunciados aglomerados de NETs (DNA, histona e MMP9) dentro dos vasos sanguíneos (NARASARAJU et al., 2011). A presença de NET nesse modelo animal de infecção por influenza parece estar associada com aumento do dano capilar alveolar, lesão hemorrágica, e obstrução das vias aéreas pequenas.

A formação de NETs induz morte de células epiteliais pulmonares e de linhagens celulares endoteliais *in vitro* (SAFFARZADEH et al., 2012), sugerindo efeitos tóxicos das NETs à barreira alvéolo-capilar. O dano das NETs observados nesse estudo foi mediado pelas histonas e MPO, mas não elastase, demonstrado com o uso de anticorpos bloqueadores. Em algumas doenças crônicas respiratórias, como fibrose cística (CF), asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), a obstrução da via aérea por uma massa densa de DNA e muco rico em proteínas é um marcador patológico. A re-análise do conteúdo de DNA extracelular no muco de pacientes adultos com as doenças mencionadas, mostrou que a maioria é originária dos neutrófilos, depositadas em NETs, medida como DNA complexado com elastase e MPO (DUBOIS et al., 2012; MANZENREITER et al., 2012; PAPAYANNOPOULOS; STAAB; ZYCHLINSKY, 2011; WRIGHT et al., 2016). O amontoado de NETs correlaciona-se com o grau de limitação do fluxo de ar (FEV1) em paciente com COPD (GRABCANOVIC-MUSIJA et al., 2015). Esses estudos estão alinhados com observações prévias de que o alto conteúdo de DNA extracelular aumenta a viscoelasticidade do muco (SHAK et al., 1990). E como tal, a extensiva formação das NETs durante as doenças respiratórias crônicas pode contribuir para com a obstrução da via aérea. Por exemplo, em pacientes com COPD, é observado

uma extensiva formação de NETs durante as exacerbações (DWYER et al., 2014; GRABCANOVIC-MUSIJA et al., 2015).

A obstrução severa das vias aéreas por muco rico em DNA também é uma característica proeminente da infecção por hRSV em crianças. Em lavagem de fluido broncoalveolar desses pacientes, as NETs são detectadas (CORTJENS et al., 2016a). As partículas de RSV podem ficar presas dentro das NETs, limitando seu espalhamento *in vitro*. Contudo, foi observado um acúmulo de NETs em uma massa densa, obstruindo as vias aéreas sem captura de antígeno viral, o que sugere uma exagerada resposta adversa. Diversos estudos propõem efeitos adversos nas respostas neutrofílicas na infecção por RSV (STOKES et al., 2011, 2013; STOPPELENBURG et al., 2014). Por exemplo, a depleção de neutrófilos resulta em menor inflamação das vias aéreas e expressão de mucinas em ratos infectados por RSV (STOKES et al., 2013), sugerindo que os neutrófilos podem contribuir com a obstrução da via aérea durante a infecção por RSV. A oclusão da via aérea por um muco denso e células recobertas por muco é característico durante a infecção por RSV e é de importância clínica relevante no desenvolvimento da falência respiratória e atelectasia (STOKES et al., 2013).

1.3. Docking Molecular

A área de bioinformática é uma área em ascensão devido a possibilidade de prover conhecimento estrutural da formação de complexos, possibilitar o entendimento sobre o funcionamento dos organismos, e no desenvolvimento e interferência em processos patológicos. O desenho de novos fármacos tem se beneficiado muito com o uso das ferramentas de bioinformática (SMITH; STERNBERG, 2002; VERLI, 2014).

A interação proteína-proteína é a base de muitas regulações biológicas. O conhecimento tridimensional (3D) das estruturas proteína-proteína é importante para uma descrição adequada da interação proteína-proteína.

Docking molecular é um termo usado para esquemas computacionais que se atentam por encontrarem a melhor ligação entre duas moléculas: um receptor e um ligante. Fornece a orientação espacial de duas moléculas e prediz

a correta associação entre elas. O docking proteína-proteína visa prever a estrutura 3D de um complexo de proteínas dadas as estruturas das proteínas individuais que a compõe (GOH; MILBURN; GERSTEIN, 2004).

Existem três categorias, dentre os diversos métodos para se realizar o docking molecular, são elas: busca global, encaixe local por forma e busca randômica.

Na busca global exaustiva, que é utilizada por softwares como ClusPro, ZDOCK e Hex Server, uma proteína é fixa e a outra é movida ao redor da que está fixada pelo algoritmo da Transformada de Fourier (FFT), que leva em conta interações eletrostáticas e termos de solvatação (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017). A busca global é utilizada quando não há informações sobre sítios de ligação, sendo necessário fazer uma busca global das orientações de ligação.

Em algoritmos de busca local por forma, as proteínas são representadas como superfícies sólidas (superfície de Connolly), e essas superfícies buscam o melhor encaixe (através de um algoritmo geométrico) entre si para que produzam uma boa complementaridade, como é o caso do Patchdock (HUANG, 2014).

A busca randômica é comumente usada para busca global ou local. Entretanto, a busca é feita em nível atômico, assim não necessitando de representações em grades (global) ou superfícies (local). O nome randômico vem do fato do método usar a Transformada de Fourier, mas iniciando e executando o processo através de pontos aleatórios e/ou movimento randomizado do ligante em torno da proteína. Softwares como Haddock, RosettaDock e SwarmDock utilizam esse tipo de docking (HUANG, 2014).

A maioria dos dockings de proteínas utiliza um algoritmo de corpo rígido, que leva em consideração a forma e o encaixe das moléculas, como é o caso do Patchdock. Quando se realiza um docking desse tipo é recomendado que se faça um refinamento pós-docking, onde a solução é melhorada por modelagem da flexibilidade da proteína e otimização da orientação de corpo rígido (DUHOVNY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo central deste trabalho foi avaliar *in vitro* o papel das NETs no curso da infecção por hRSV.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Avaliar a ação das NETs frente à infecção viral nos ensaios de pré-tratamento;
- b) Avaliar a ação das NETs frente à infecção viral nos ensaios de pós-tratamento;
- c) Avaliar possíveis interações entre proteínas da NET (mieloperoxidase/catepsina G) e a proteína F do hRSV através de ensaios de *docking molecular*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1. Declaração de ética

Todos os procedimentos experimentais utilizando sangue humano foram aprovados pelo Comitê de Ética local em Pesquisa Humana da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – FCL UNESP (42048315.5.0000.5401; <http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/login.jsf>). Cada voluntário assinou um formulário de consentimento, como sugerido e aprovado pelo Comitê.

3.2. Cultura Celular

Células Hep-2 (carcinoma de orofaringe), são provenientes do trato respiratório humano e permissivas à infecção e replicação do vírus hRSV (GUPTA et al., 1996a; SRINIVASAKUMAR; OGRA; FLANAGAN, 1991) portanto estas células foram utilizadas para performar nossos experimentos. Obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (Corning Glass Works, Nova York, NY, USA), incubadas em estufa umedecida à 37°C e 5% de CO₂ e meio de cultura DMEM F12 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil,) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

3.3. Estoque viral

O vírus hRSV cepa A2, cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Professor Livre-docente de Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP) foi amplificado em culturas de células Hep-2. Os estoques virais foram

preparados em meio de cultivo DMEM F12 incompleto (não acrescido de SFB). Após a coleta do estoque viral, as alíquotas foram congeladas em DMEM F12 acrescido de trealose 10% e mantidas em freezer a -80°C até o momento do uso (GUPTA et al., 1996b). O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimm-Breschkin, 2004 e confirmado pelo ensaio de TCDI₅₀ (RASMUSSEN et al., 2011).

3.4. Purificação de neutrófilos humanos

Partindo do sangue periférico de voluntários declarados saudáveis, 10mL de sangue foram obtidos utilizando tubos de coleta de sangue contendo citrato de sódio Vacutainer de plástico (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). A amostra sanguínea, foi então colocada, cuidadosamente sobre 6mL de meio de separação Histopaque 1119 e 1077 (Sigma-Aldrich), sendo 3ml de cada densidade. As amostras foram centrifugadas a 700g, durante 30 minutos à 25° C, aceleração 1 e frenagem 0. Após a centrifugação ocorre a formação de quatro fases, onde a primeira (plasma) e segunda camadas (mononucleares) são descartados em solução de hipoclorito de sódio (5%), a terceira camada (histopaque e neutrófilos), são coletados e colocados em um novo tubo falcon, a quarta e última camada (hemácias) são descartadas juntamente ao plasma e aos mononucleares. A parte referente aos neutrófilos foi lavada em PBS (mais ou menos duas vezes o volume de células), à 800g por 5 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI sem soro. A contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany), partindo da suspensão diluída 20 vezes em solução de Turk (20mL ácido acético glacial, 0.5g azul de metileno e água para 1L). E então, os neutrófilos foram estimulados para a geração de NETs.

3.5. Estimulação de neutrófilos humanos para geração das NETs.

NETs foram geradas seguindo modificações no procedimento descrito por Brinkmann et.al., 2010 com modificações (NAJMEH et al., 2015;

SAFFARZADEH et al., 2012). Neutrófilos isolados e diluídos em RPMI sem soro foram adicionados em uma placa de 6 poços (1.8×10^6 /poço) com PMA na concentração de 25nM. A placa foi incubada por 3 horas, à 37°C em estufa umidificada e 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e as NETs foram lavadas dos poços, com a adição de 1ml de meio RPMI sem soro, foram então coletadas, separadas em amostras e incubadas em banho-maria a 37°C ou a 40°C por 24 horas. Algumas amostras não sofreram incubação, foram apenas armazenadas, sendo consideradas NETs frescas. Às amostras de NET frescas foram adicionado 5µl de DNase para fragmentar (soltar) o DNA da amostra, foi deixado agir por 5 minutos, e então foi adicionado 5µl de EDTA para parar a ação da DNase, ambos reagentes da Thermo Scientific. Após a incubação, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação à 800g por 5 minutos e o sobrenadante armazenado em freezer -25°C. Para a quantificação do DNA foi utilizado o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Inc, Grand Island, NY, USA) através do kit PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen).

3.6. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase

As amostras NET fresca, NET à 37°C e NET à 40°C, foram avaliadas quanto a sua atividade de mieloperoxidase. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 50 µl/poço de cada amostra de NETs (sendo feito triplicata para cada amostra) e como controle negativo foi utilizado meio RPMI sem soro. Então, em cada condição, foi adicionado substrato para mieloperoxidase (0.88mM), *3,3',5,5'-tetrametilbenzidina*. Foram deixadas incubadas por 1 hora em estufa umidificada à 37°C, 5% de CO₂. Após a incubação foi adicionado o *stopper* (100 µl/poço), para parar a reação, em seguida foi feita a leitura da absorbância em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), comprimento de onda de 405 nm. NETs fresca, que não passaram por período de incubação foram consideradas como 100% de atividade de mieloperoxidase. Os valores de absorbância foram equivalentes em cada amostra.

3.7. Avaliação da ação anti-hRSV das NETs.

Para avaliação da ação antiviral das NETs foram realizados ensaios de viabilidade celular através da adição do sal de MTT, contagem de sincícios sob microscopia de luz branca, coloração das células por azul de trypan e cálculo do tamanho dos sincícios. Nos ensaios realizados, células Hep-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^4 /poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10%, em estufa à 37°C umidificada 5% de CO₂. Neste trabalho foram realizadas duas abordagens metodológicas para avaliação da ação antiviral das NETs, foram realizados ensaios de pré e pós tratamento.

3.7.1. Ensaio de pré-tratamento

Com o objetivo de avaliar a ação da NET nas células antes da infecção viral, realizamos o teste de pré-tratamento. Às células previamente plaqueadas em placas de 96 poços, mantidas em cultura por 24h para um crescimento confluyente, foram adicionados diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL), somente aos poços correspondentes ao tratamento com NETs e foram deixadas incubando em estufa à 37°C umidificada com 5% de CO₂, por 2 horas. Em seguida, toda a suspensão com NETs é retirada e adiciona-se as suspensões virais (MOI 0.1, 0.5 e 1.0) e incuba-se por 2 horas novamente, em estufa à 37°C. Após retira-se toda a suspensão viral e adiciona-se 200µl de meio DMEM-F12 livre de SFB e mantêm-se a placa em incubação por 3-4 dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Como controle viral alguns poços receberam apenas as suspensões virais (MOI 0.1, 0.5 e 1.0), poços que não receberam nenhum tipo de tratamento, apenas meio de cultura, foram assumidos como controle celular. No terceiro dia houve a contabilização dos sincícios formados e foram feitas fotos dos poços. No quarto dia, as células foram coradas com azul de trypan e a viabilidade celular foi determinada com o auxílio do ensaio colorimétrico com sal de MTT.

3.7.2. Ensaio de Pós-Tratamento

Células Hep-2 foram cultivadas em placa de 96 poços (5×10^4 células/poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10%, em estufa à 37°C umidificada 5% de CO₂, posteriormente, as células foram infectadas com soluções de hRSV (MOI 0.1, 0.5 e 1.0), em quadruplicata, e incubadas por 2 horas à 37°C. Em seguida, a suspensão viral é substituída por diferentes concentrações de NET (0,5-16µg/ml) em um volume final de 100µl/poço. Então, a placa foi incubada por 3-4 dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. No segundo dia após a infecção, todos os poços da cultura foram acrescidos de 100µL de DMEM-F12 livre de SFB com o intuito de manter os nutrientes celulares e a validade dos antibióticos. Células que não receberam nenhum tratamento posterior, foram infectadas com o vírus como controle da infecção viral e células que não receberam nenhum tipo de tratamento foram assumidas como controle celular. No terceiro dia da infecção, os sincícios são contabilizados, são tiradas fotos dos poços, as células são coradas com azul de trypan e a viabilidade celular (em triplicata) será determinada com o auxílio do ensaio colorimétrico com sal de MTT.

3.8. Ensaio com coloração por azul de trypan

Preparo da solução estoque de azul de trypan, 0,4%. Para isso, diluímos 120 mg do Trypan Blue em 30 mL de PBS 1x, obtendo uma solução de 4mg/mL (0,4%). Centrifugar antes do uso, durante 10 minutos, 2000 rpm. E então adiciona-se 50µl/poço, um poço por vez, deixa agir por 30 segundos, tira o sobrenadante e visualiza em microscopia de luz branca, tira fotos correspondentes a cada tratamento.

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

A adição do sal de MTT [1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan] em nossos testes foi feita seguindo as recomendações do fabricante (Sigma). Após os respectivos tratamentos em placas de 96 poços, o meio de cultura foi substituído por 100 µl de solução de MTT (0.5 mg/mL diluído em DMEM F12) e a placa foi levada à incubação por 2

horas, à 37°C em estufa umidificada e 5% de CO₂. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por 50µl de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma) para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), com comprimento de onda de 560 nm. A metabolização do sal é diretamente proporcional à taxa metabólica, possibilitando assim inferir a viabilidade celular a partir da absorbância mensurada (Equação 1).

Equação (1)

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

3.10. Cálculo da área dos sincícios

Foi desenvolvido um algoritmo baseado em processamento de imagens e reconhecimento de padrões, que tem por objetivo fazer a mensuração da área dos sincícios. O algoritmo carrega a imagem da placa de 96 poços, retirada com uma câmera acoplada ao microscópio invertido (Nikon eclipse TS 100), para então aplicar uma série de filtros digitais que visam transformar e padronizar a imagem, para uma binária cujos objetos formados pelos pixels com valor um (cor branca) representam a área do sincício. E em seguida foi feita a conversão de pixels em milímetro quadrado.

3.11. Análise

Todos os ensaios tiveram por amostras controle (i) células não tratadas e não infectadas e (ii) células não tratadas que foram infectadas com o vírus. A viabilidade celular foi avaliada no terceiro/quarto dia através do ensaio colorimétrico utilizando sais de MTT, e a leitura de absorbância foi realizada em aparelho de espectrofotometria a 560nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de células viáveis assumindo o controle celular não

tratado e não infectado como 100% de viabilidade. A porcentagem de proteção obtida em cada tratamento foi calculada como se segue:

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

Onde:

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

DO_{AT} é a densidade óptica obtida para cada uma das amostras-teste – DO_{CV} (densidade óptica do controle viral) e

DO_{CC100} é DO_{CC} – DO_{CV} (densidade óptica do controle celular – densidade óptica do controle viral).

3.12. Análise Estatística

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

3.13. Análises de Bioinformática

3.13.1. Screening por docking molecular.

Estruturas tridimensionais das proteínas F (PDB 4JHW), mieloperoxidase (PDB 1DNU) e catepsina G (PDB 1AU8) foram obtidas no Protein Data Bank (PDB). A proteína F é um componente essencial do vírus hRSV e indispensável para sua penetração na célula hospedeira. As proteínas mieloperoxidase e catepsina G compõem as NETs e estão relacionadas à ação microbicida das NETs. A estrutura tridimensional do anticorpo motavizumab (PDB 3IXT) também foi utilizada, como forma de comparação entre os complexos formados. A estrutura monomérica da proteína F, obtida pelo Protein Data Bank, foi utilizada para gerar a sua estrutura trimérica, utilizando o programa online Symmdock (Duhovny et al., 2002).

4. RESULTADOS

4.1. Geração das NETs

Para este estudo, as NETs foram geradas por neutrófilos estimulados com PMA (25nM) na ausência de soro fetal bovino (SFB) (Von Köckritz-Blickwede, 2009). Os densos aglomerados de NETs foram dissolvidos em banho-maria (24h) à 37°C ou à 40°C, na ausência de DNase. A atividade enzimática nas amostras foi monitorada através da avaliação de atividade enzimática de mieloperoxidase (Figura 6A). Neste ensaio, a atividade de MPO presente nas amostras de NETs frescas, preparadas à 25°C (2h) na presença de DNase, foram consideradas como 100% de atividade. O aumento da temperatura (37 ou 40°C), do tempo de preparo e ausência de DNase resultou em queda de aproximadamente 50% da atividade de MPO (43,76% à 37°C e 45,36% à 40°C). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de NETs geradas à 37 ou 40°C. Para a continuidade do estudo, foram utilizadas NETs preparadas à 40°C, na ausência de DNase e que apresentaram fragmentos de elevado tamanho (> 10.000pb) (Figura 6B).

4.2. Curso da infecção por hRSV em células pré-tratadas com NETs

Nos ensaios de pré tratamento, células Hep-2 foram incubadas com diferentes concentrações de NETs (0.5 – 16 µg/mL) por 2h à 37°C antes de serem infectadas com diferentes MOIs de hRSV (0.1, 0.5 ou 1.0). No terceiro dia de cultivo, as células foram avaliadas quanto à sua morfologia, formação ou não de sincícios e viabilidade celular.

Os resultados correspondentes ao inóculo viral de MOI 0.1 demonstraram que o prévio contato das células, com baixas concentrações de NET (0.5-2 µg/mL), mantiveram a taxa metabólica em níveis muito próximos aqueles apresentados por células não tratadas (CV) (Figura 7A). O aumento da concentração das NETs (4-16 µg/mL) eleva a absorvância pelo sal de MTT, se equivalendo ao controle celular (CC). O ensaio de MTT pode ser usado como uma medida indireta da viabilidade celular. Estas observações foram complementadas e corroboradas com a análise de células coradas com azul de

trypan (Figura 7D). Nota-se assim, uma melhora na viabilidade celular conforme as células foram previamente tratadas com crescentes concentrações de NET.

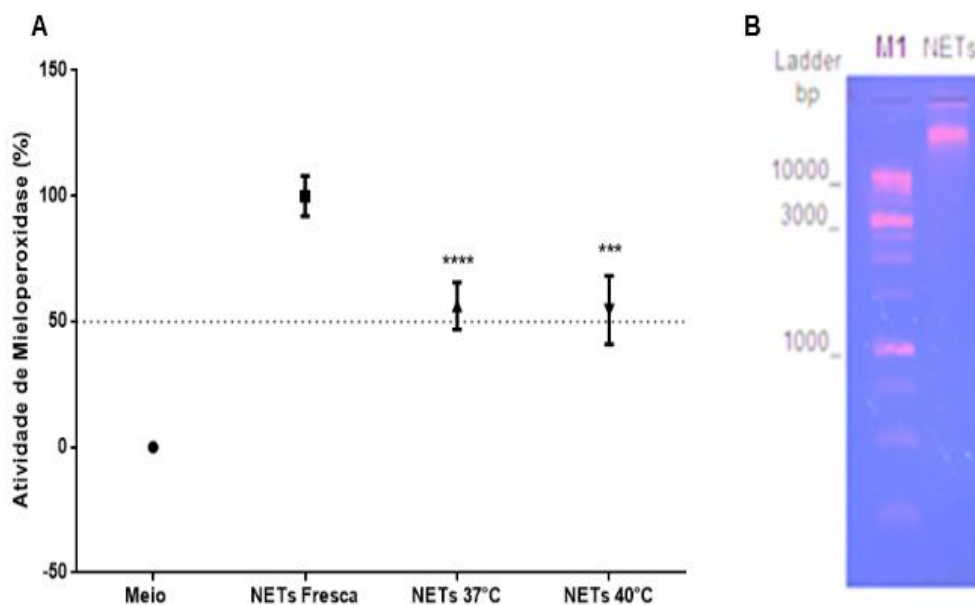


Figura 6. Avaliação da atividade da mieloperoxidase. (A) NETs frescas e NETs que passaram pelo período de 24h no banho-maria (à 37°C e à 40°C), foram incubadas com substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzideneína) por 1 hora. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura (RPMI sem soro), sendo as NETs frescas consideradas como controle positivo (100% de atividade). A absorbância das amostras foi feita em um leitor de microplaca em 450nm. O gráfico representa a média de experimentos realizados em triplicata, onde **** = $p < 0,0001$. (B) Análise eletroforética das NETs (40°C) em gel de agarose 1.5%, onde M1 = Marcador molecular de DNA (1kb DNA ladder).

Destacamos que, as regiões celulares que apresentam maior concentração de azul de trypan correspondem às regiões de formação de sincícios (Figuras 7D). Paralelamente, foram quantificados o número e a área de extensão dos sincícios formados nas diferentes condições. Observa-se que há um decaimento no número e no tamanho dos sincícios em monocamadas de células que foram previamente tratadas com concentrações mais elevadas das NETs (8-16 $\mu\text{g/mL}$) (Figuras 7B e 7C).

Com o aumento do inóculo viral para MOI 0.5, algumas mudanças com relação ao MOI 0.1 foram observadas. A taxa metabólica das células se manteve baixa em todas as concentrações testadas de NETs (Figura 8A). A viabilidade celular observada pela coloração com azul de trypan indica morte celular semelhante em todas as células infectadas, tratadas ou não tratadas com NETs (Figura 8D). Foge deste padrão aquelas células tratadas com NETs 16 µg/mL, onde observamos um menor número de células coradas com azul de trypan com relação ao controle viral. Além disso, nestes poços observamos ainda redução no número e no tamanho dos sincícios, associada à um distanciamento entre as células da monocamada. Nas demais concentrações (0.5-4 µg/mL), embora haja uma redução na dimensão dos sincícios, o número deles se equivale ao controle viral (Figuras 8B e 8C).

O maior inóculo testado por nós, MOI 1.0, apresentou resultados muito semelhantes aqueles obtidos com MOI 0.5. Ou seja, o prévio contato das células com as NETs resulta em queda do número de sincícios (8-16 µg/mL) e queda na dimensão dos sincícios (0.5-16 µg/mL) (Figuras 9B e 9C), mantendo-se uma baixa taxa metabólica (Figura 9A) e viabilidade celular (Figura 9D).

4.3. Curso da infecção por hRSV em células pós-tratadas com NETs

Testes de pós tratamento foram realizados com inóculos virais nos MOIs 0.1, 0.5 e 1.0. Células Hep-2 foram incubadas com o vírus nos diferentes MOIs por 2h. Após a incubação, as monocamadas de células foram mantidas por 3 dias na presença de diferentes concentrações de NETs (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia, as células foram analisadas microscopicamente quanto a sua morfologia, a formação ou não de sincícios, bem como foi feita a coloração com azul de trypan para a visualização da ocorrência ou não de morte celular. Mais uma vez, células infectadas foram usadas como controle viral (CV) e células não infectadas e não tratadas, como controle celular (CV).

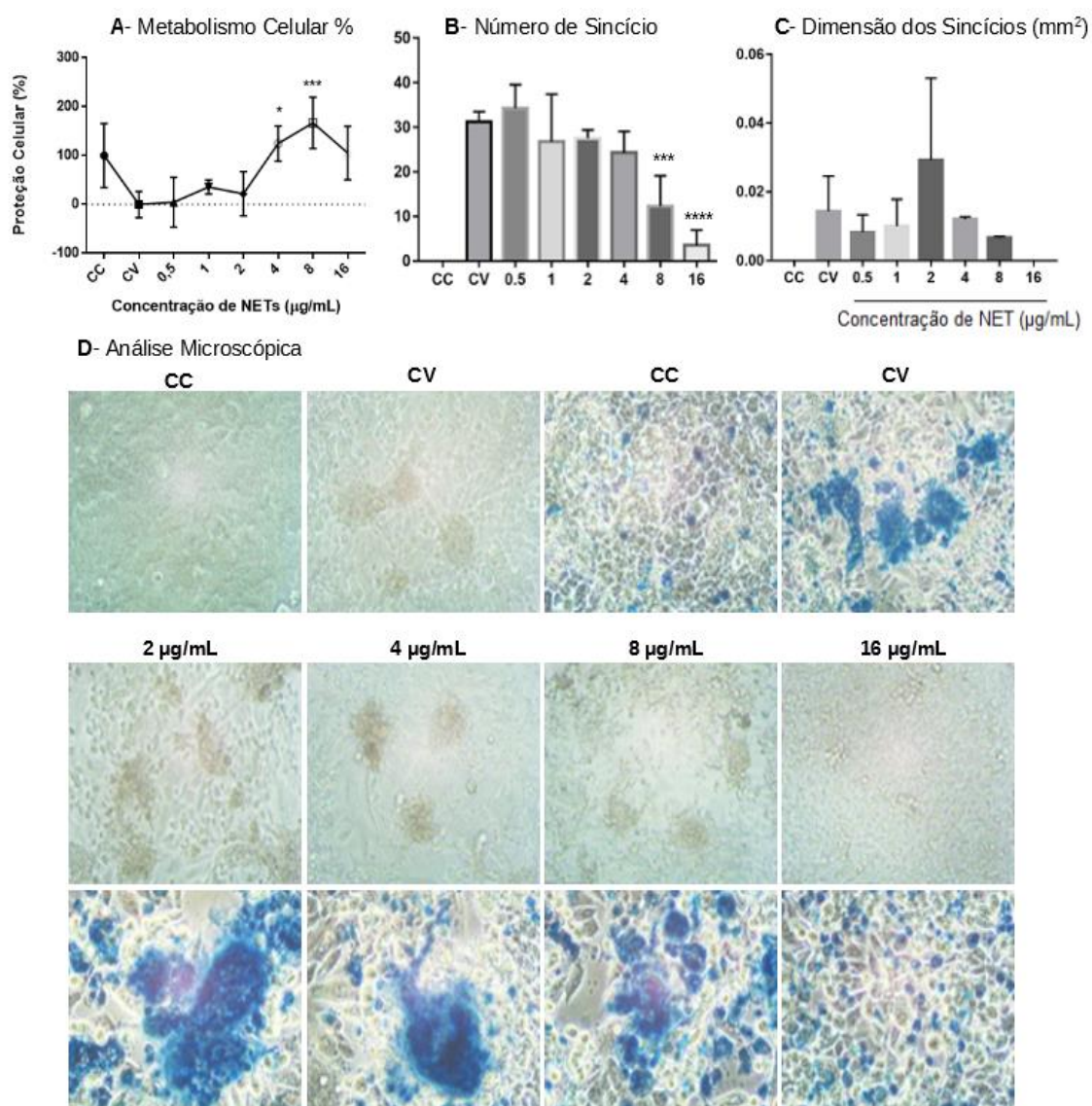


Figura 7. Efeito das NETs no pré-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL) e infectadas com hRSV (MOI 0.1). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e viabilidade celular por incorporação de azul de trypan, onde CC corresponde a células que não receberam nenhum tipo de tratamento; CV, células que receberam apenas vírus no MOI 0.1 e células que receberam tratamento de NET nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos \pm desvio padrão, onde o valor de $p < 0,0001$.

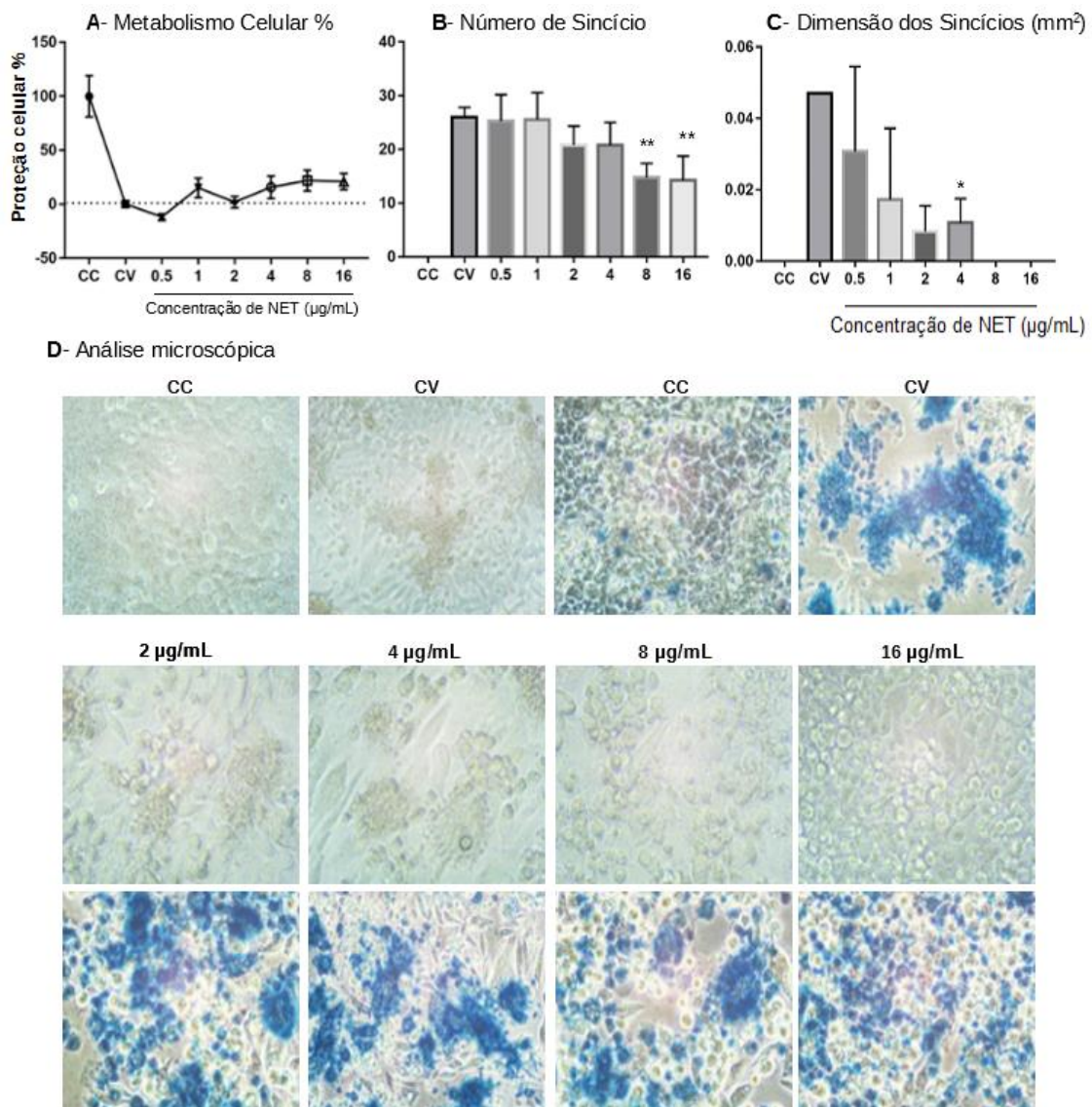


Figura 8. Efeito das NETs no pré-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL) e infectadas com hRSV (MOI 0.5). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e viabilidade celular por incorporação de azul de trypan, onde CC corresponde a células que não receberam nenhum tipo de tratamento; CV, células que receberam apenas vírus no MOI 0.5 e células que receberam tratamento de NET nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão, onde o valor de $p < 0,0001$.

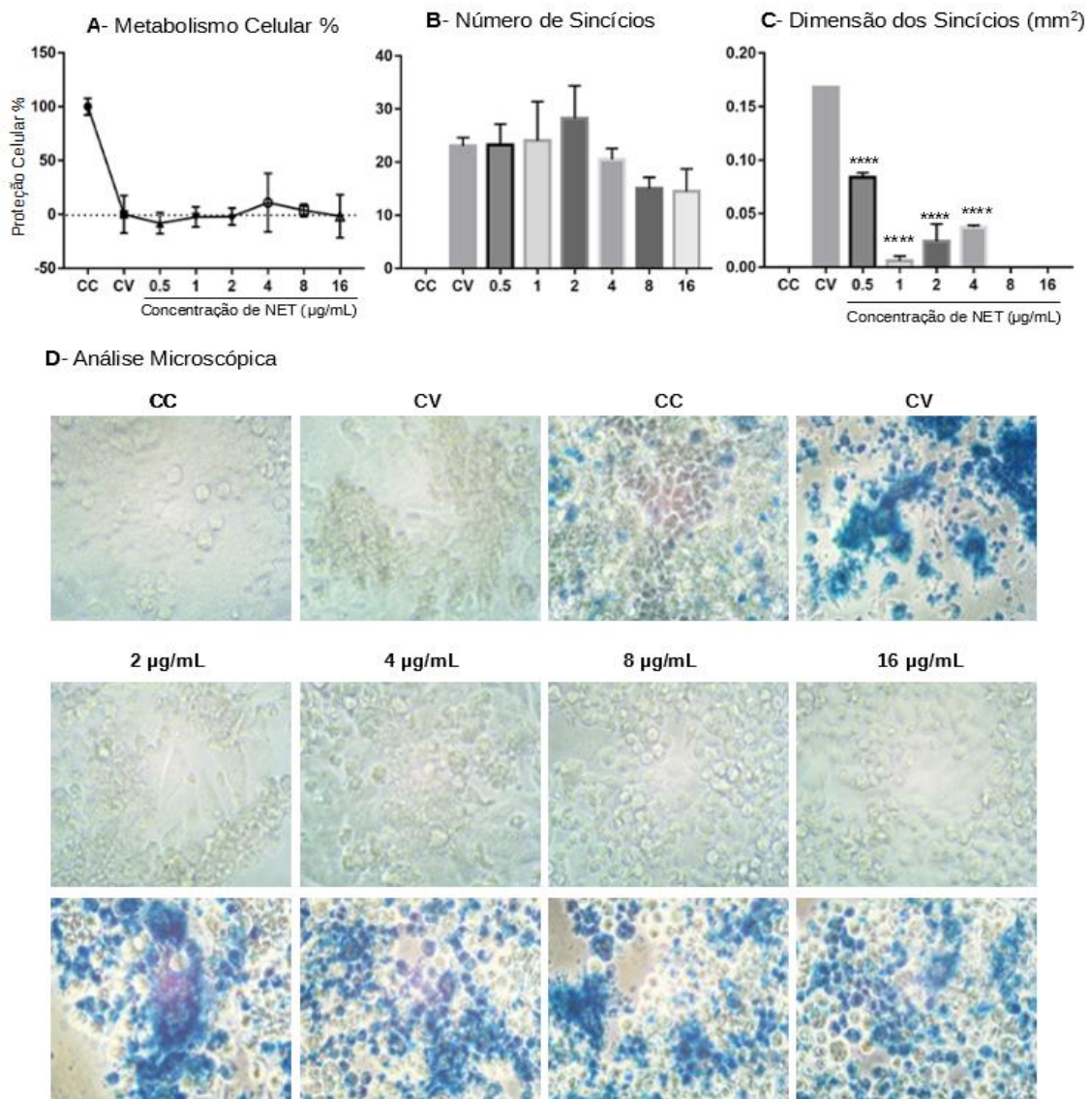
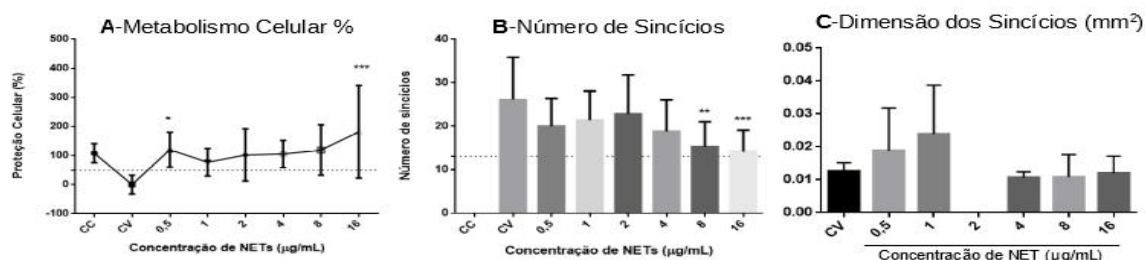
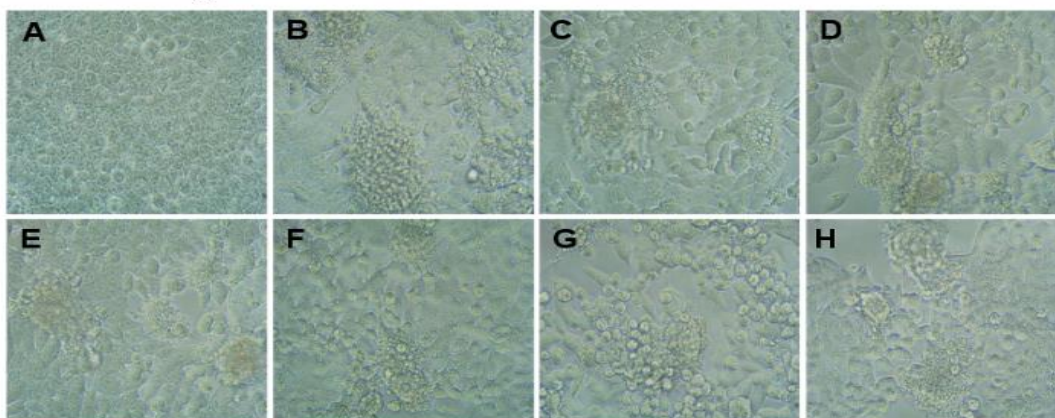


Figura 9. Efeito das NETs no pré-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL) e infectadas com hRSV (MOI 1.0). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e viabilidade celular por incorporação de azul de trypan, onde CC corresponde a células que não receberam nenhum tipo de tratamento; CV, células que receberam apenas vírus no MOI 0.1 e células que receberam tratamento de NET nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão, onde o valor de $p < 0,0001$.



D- Análise Morfológica



E- Viabilidade Celular

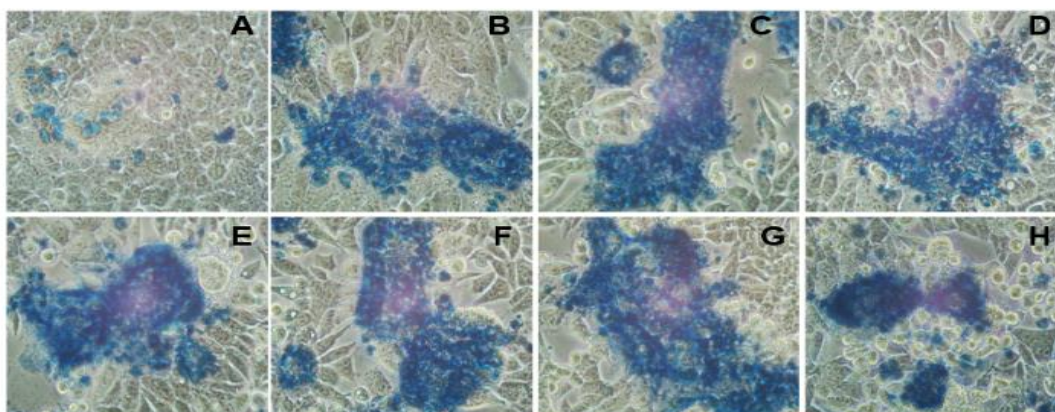
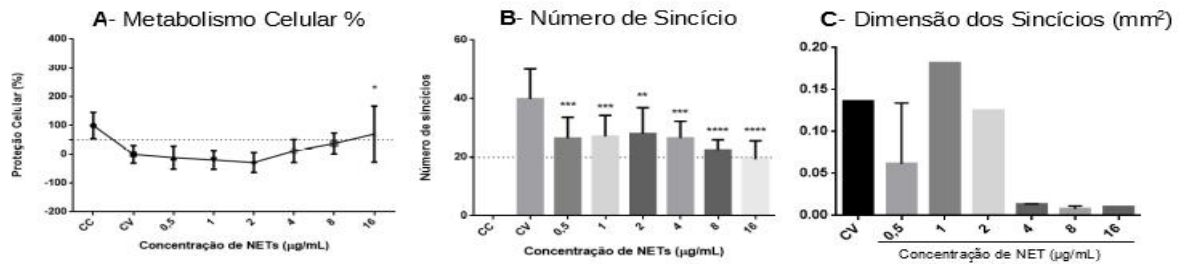
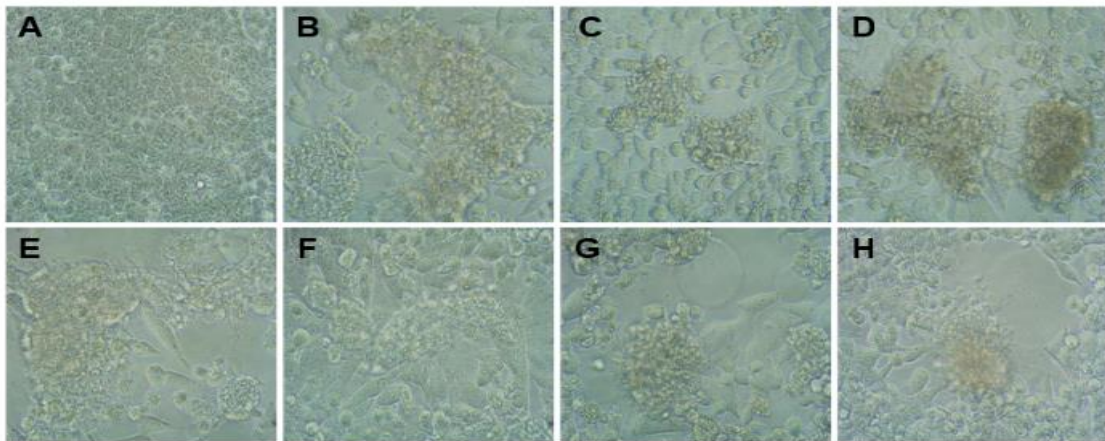


Figura 10. Efeito das NETs no pós-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI 0.1) e então cultivadas na presença de diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e (E) viabilidade celular por incorporação de azul de trypan. Nas imagens D e E, as letras representam a presença ou ausência dos tratamentos. Em

A- células que não receberam nenhum tipo de tratamento; B- células que receberam apenas vírus; de C à H- células que receberam tratamento com NETs nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão, onde o valor de $p < 0,0001$.



D- Análise Morfológica



E- Viabilidade Celular

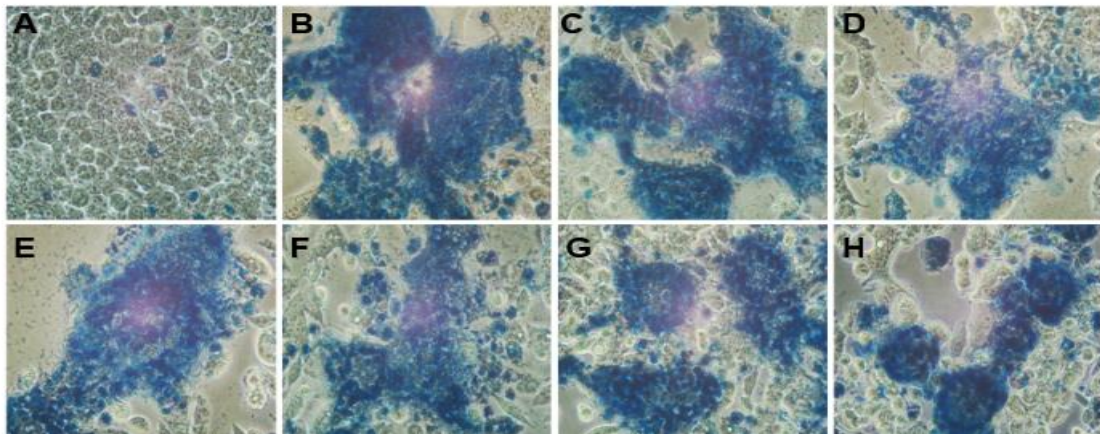
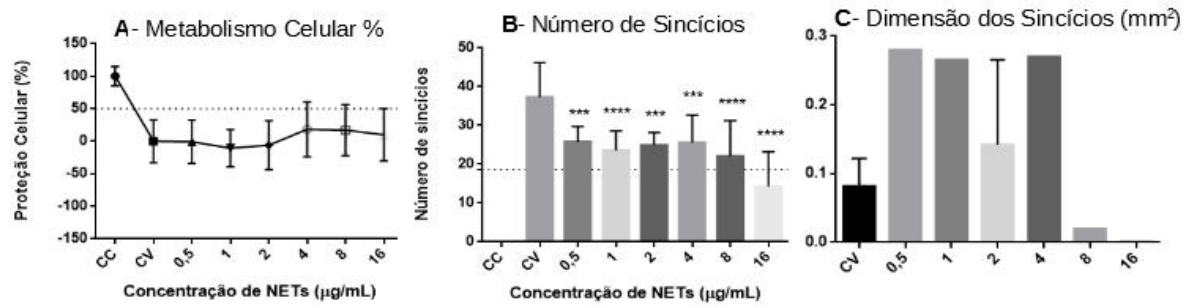


Figura 11. Efeito das NETs no pós-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI 0.5) e então cultivadas na presença de diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e (E) viabilidade celular por incorporação de azul de

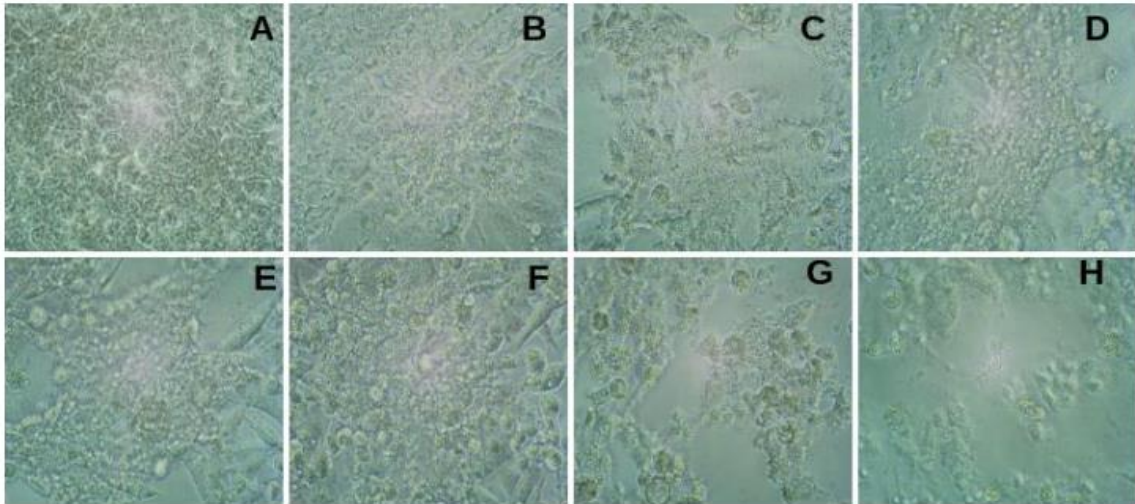
trypan. Nas imagens D e E, as letras representam a presença ou ausência dos tratamentos. Em A- células que não receberam nenhum tipo de tratamento; B- células que receberam apenas vírus; de C à H- células que receberam tratamento com NETs nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos \pm desvio padrão, onde o valor de $p < 0,0001$.

Nossos testes com MOI 0.1 mostram uma tendência no aumento do metabolismo celular pós contato com concentrações crescentes de NETs (Figura 10A). Porém, em virtude da amplitude do desvio padrão experimental, as únicas concentrações estatisticamente diferentes foram 0.5 e 16 µg/mL. A análise microscópica destas células, coradas ou não com azul de trypan, indica uma intensa presença de células mais alongadas, maior espaçamento entre as células e maior morte celular quando comparadas com o controle celular. Estes parâmetros se apresentaram comparáveis ao controle viral (Figura 10D e 10E). Com relação às características dos sincícios, concentrações menores de NETs (0.5 e 1 µg/mL) mantiveram o número de sincícios mas com tamanho aumentado, enquanto que concentrações maiores de NETs (8 e 16 µg/mL) resultaram em diminuição do número de sincícios mas com dimensão semelhante ao controle viral (Figura 10B e 10C).

Com o aumento do inóculo viral para o MOI 0.5, os resultados foram semelhantes, com pequenas alterações. Os dados do metabolismo celular foram mais homogêneos, mostrando novamente uma tendência de aumento nos valores deste parâmetro após tratamento das células com as NETs, porém, apenas a concentração de 16 µg/mL mostrou-se estatisticamente significativa (Figura 11A). A intensa coloração com azul de trypan (Figura 11E) corrobora os dados do sal de MTT mostrando haver morte celular equivalente entre células tratadas com NETs e células do controle viral. A análise morfológica indica a presença de células mais alongadas e escassas nos poços que foram cultivados com as NETs. Nota-se ainda, uma redução no número de células quando as estas foram tratadas com concentrações mais elevadas de NETs (8 e 16 µg/mL) (Figura 11D). Com relação ao número de sincícios, todas as condições testadas resultaram numa diminuição numérica deles (Figura 11B). Por outro lado, apenas concentrações mais elevadas (4-16 µg/mL) indicaram redução na dimensão de tais estruturas (Figura 11C).



D- Análise Morfológica



E- Viabilidade Celular

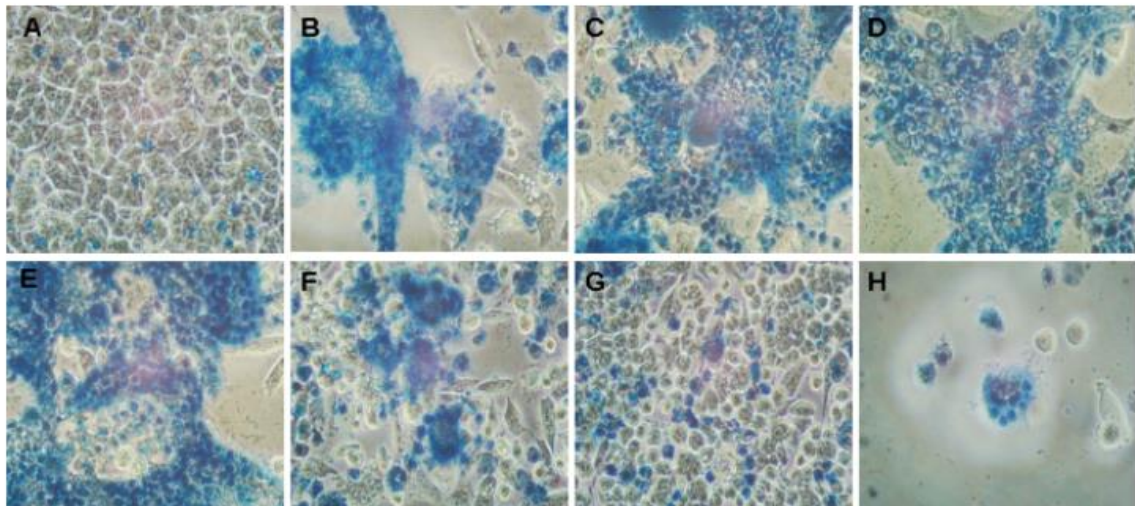


Figura 12. Efeito das NETs no pós-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI 1.0) e então cultivadas na presença de diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios e (D) morfologia e (E) viabilidade celular por incorporação de azul de trypan. Nas imagens D e E, as letras representam a presença ou ausência dos tratamentos. Em A- células que não receberam nenhum tipo de tratamento; B- células que receberam apenas vírus; de C à H- células que receberam tratamento com NETs nas concentrações de 0,5 µg/mL,

1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão, onde o valor de $p < 0,0001$.

Ao elevarmos o MOI testado para 1.0, a taxa metabólica das células se manteve semelhante aquele apresentado pelo controle viral independente da concentração de NET utilizada (Figura 12A). A análise morfológica das células indica que, quando o tratamento foi feito com concentrações menores de NETs (0.5-4 µg/mL), a dimensão dos sincícios foi elevada, sendo maiores do que o controle viral (Figura 12C e 12D). Tais observações foram confirmadas através do dimensionamento quantitativo dos sincícios (Figura 12B). Observamos ainda, que nas maiores concentrações de NETs (8-16 µg/mL) houve uma redução no número de células aderentes nos poços e na dimensão dos poucos sincícios ali encontrados (Figura 12D). A contagem do número de sincícios mostra uma queda significativa em todas as concentrações de NET testadas em comparação ao controle viral (Figura 12B). Além de ser observado uma queda na viabilidade (Figura 12E).

4.4. Análises de docking molecular

Para a realização do *docking molecular*, foi utilizado o banco de dados Protein Data Bank para buscar as estruturas de cristalografia referentes à proteína F do hRSV e de ambas proteínas das NETs (MPO e Cat G). A estrutura do anticorpo Motavizumab (PDB 3IXT), foi buscada por já ter sua interação com a proteína F descrita e será utilizado em comparação com os outros complexos gerados. Ele interage com o sítio A (sítio II) da proteína F que neutraliza a fusão do vírus com a célula (McLellan et al., 2010) (Figura 13A).

A estrutura da proteína F na conformação de pré-fusão, obtida pelo PDB encontra-se na forma monomérica (4JHW). O trímero foi gerado utilizando-se o servidor Symmdock. Dentre as 100 estruturas geradas, escolhemos o modelo que apresentou maior *score*, 13186 (pontuação utilizada para indicar os melhores complexos gerados) e maior área de contato entre os domínios de oligomerização (Figura 13B). Esta mesma estrutura foi usada para a realização

dos *dockings moleculares* deste estudo. A descrição do trímero foi compatível com aquela observada na literatura (McLellan et al., 2013). As estruturas escolhidas para a mieloperoxidase (PDB 1DNU) e catepsina G (PDB 1AU8) seguiram os mesmos critérios (Figuras 13C e 13D).

As análises de *docking molecular* entre a proteína F e o anticorpo motavizumab (PDB 3IXT) (Figura 14A) foram realizadas pelo servidor Patchdock, com refinamento de dados pelo Firedock. A interação da proteína F com o anticorpo motavizumab, ocorreu no sítio A da proteína F (Figura 14B e 14C) com energia de -14,62 kcal/mol, alto *score* (13076) e uma área extensa de superfície de contato entre as duas proteínas de 1772.20 Å.

Os melhores modelos dos complexos gerados entre proteína F e mieloperoxidase, via Patchdock e refinadas pelo Firedock, apresentaram energia de -27,84 kcal/mol, alto *score* de 12630 e uma alta área de superfície de contato de 1671,40 Å (Figura 15 A,B,C). A baixa energia qualifica o complexo como possível e estável já que, quanto menor a energia de ligação de um complexo, mais estável é sua interação. Além disso, os dados foram semelhantes aqueles obtidos para o anticorpo Motavizumab.

Os servidores apontaram dois prováveis sítios de interação para MPO e proteína F. O primeiro localiza-se próximo do sítio I, o qual interage com alguns anticorpos, porém com pouca ou sem atividade de neutralização (KILLIKELLY; KANEKIYO; GRAHAM, 2016a). O segundo trata-se do sítio de glicolisação. Dos sítios de glicolisação, o n500 é o mais importante quando se diz respeito a atividade de fusão (ZIMMER; BUDZ; HERRLER, 2001), quando essa região é mutada há uma drástica redução na formação de sincícios (ZIMMER; BUDZ; HERRLER, 2001).

O *docking molecular* entre a catepsina G e a proteína F também apresentou bom valor de energia (-26,95 kcal/mol) para o melhor modelo do *rank*, *score* de 13302, e uma área de interação de 1875.30 Å, sendo possível que haja interação entre essas proteínas. A interação se deu próxima do sítio C, conhecido na literatura por se ligar aos anticorpos MAb19 (ARBIZA et al., 1992) e 101F (WU et al., 2007b), ambos neutralizantes de hRSV, e do sítio A (II), mesmo sítio de interação para o Motavizumab (Figura 16A-B).

As análises *docking molecular* foram ainda repetidas para a proteína F na sua conformação de pós-fusão. O modelo escolhido da proteína pós fusão (PDB 3RRR) (Figura 17A), seguiu os mesmos moldes da escolha das outras proteínas.

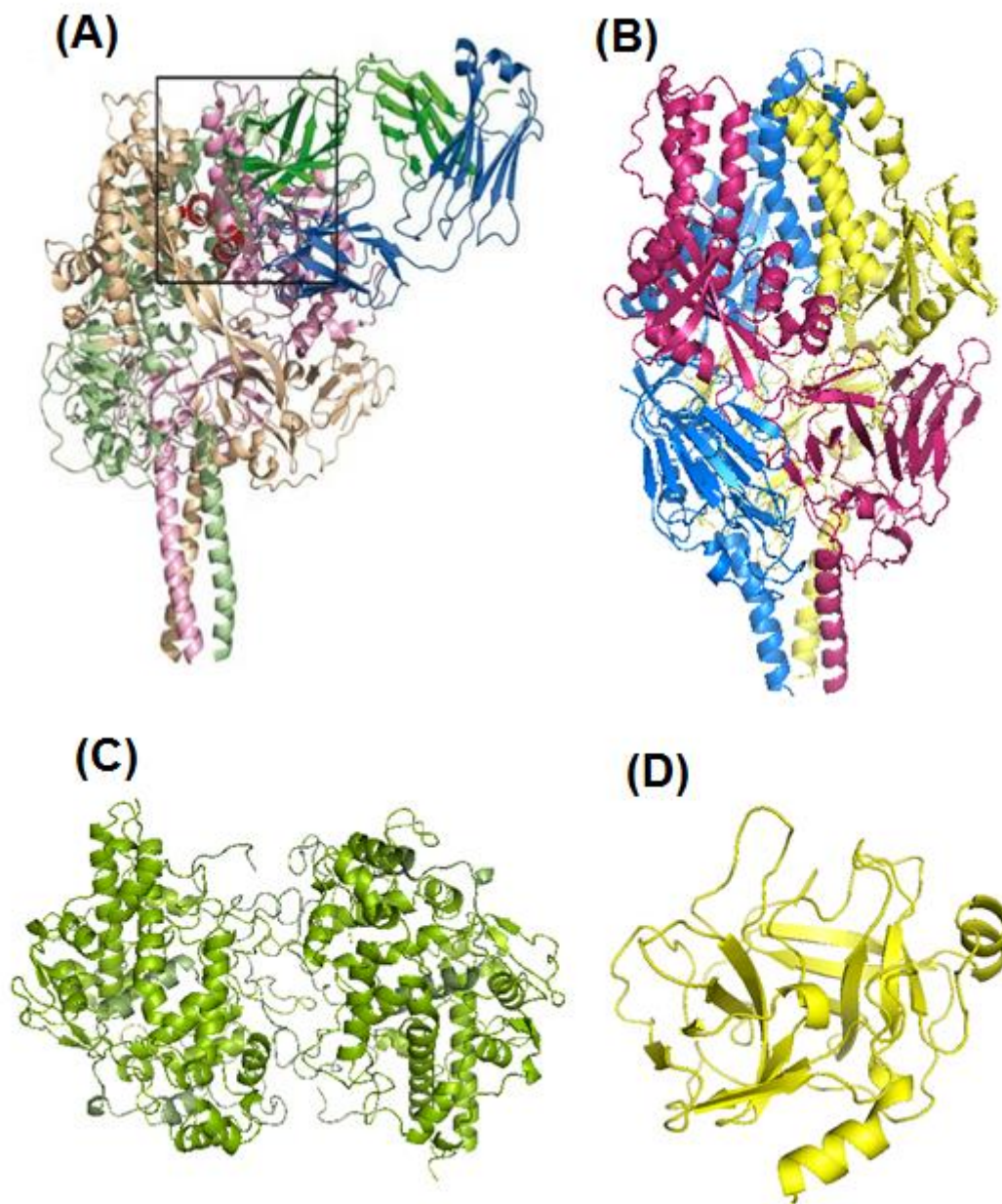


Figura 13. (A) Motavizumab complexado com a região do sítio A da proteína F pré-fusão, descrito na literatura. Adaptado de McLellan et al., 2010. (B) Trímero da proteína F pré-fusão gerado pelo servidor Symmdock, por Sampaio et al. (C) Mieloperoxidase no seu estado funcional, dímero, PDB 1DNU. (D) Catepsina G, PDB 1AU8.

O *docking molecular* foi realizado pelo servidor Patchdock e posteriormente refinado pelo Firedock. Da interação entre proteína F pós-fusão

e motavizumab, a ligação se deu no sítio II como descrito na literatura (MCLELLAN et al., 2011), com baixa energia de ligação -21,09 kcal/mol, alto score (11144) e alta área de interação 1384.90 Å (Figura 12 B-C).

Da interação entre proteína F-pós fusão e MPO (Figura 18 A,B,C), as conformações obtidas apresentaram baixa energia de ligação (-13,06 kcal/mol), score 12046 e área de interação 2215.60 Å, e a interação se deu próxima à região do sítio A e C.

A interação proteína F-pós e catepsina G (Figura 19 A,B,C), também apresentou bom valor de energia -26,76 kcal/mol, valor de score 13070 e área de interação 1720.60 Å, sendo bons indicativos da possibilidade de ocorrência da interação. Além disso, a interação se deu próxima do sítio antigênico IV e I (Figura 19 A-C).

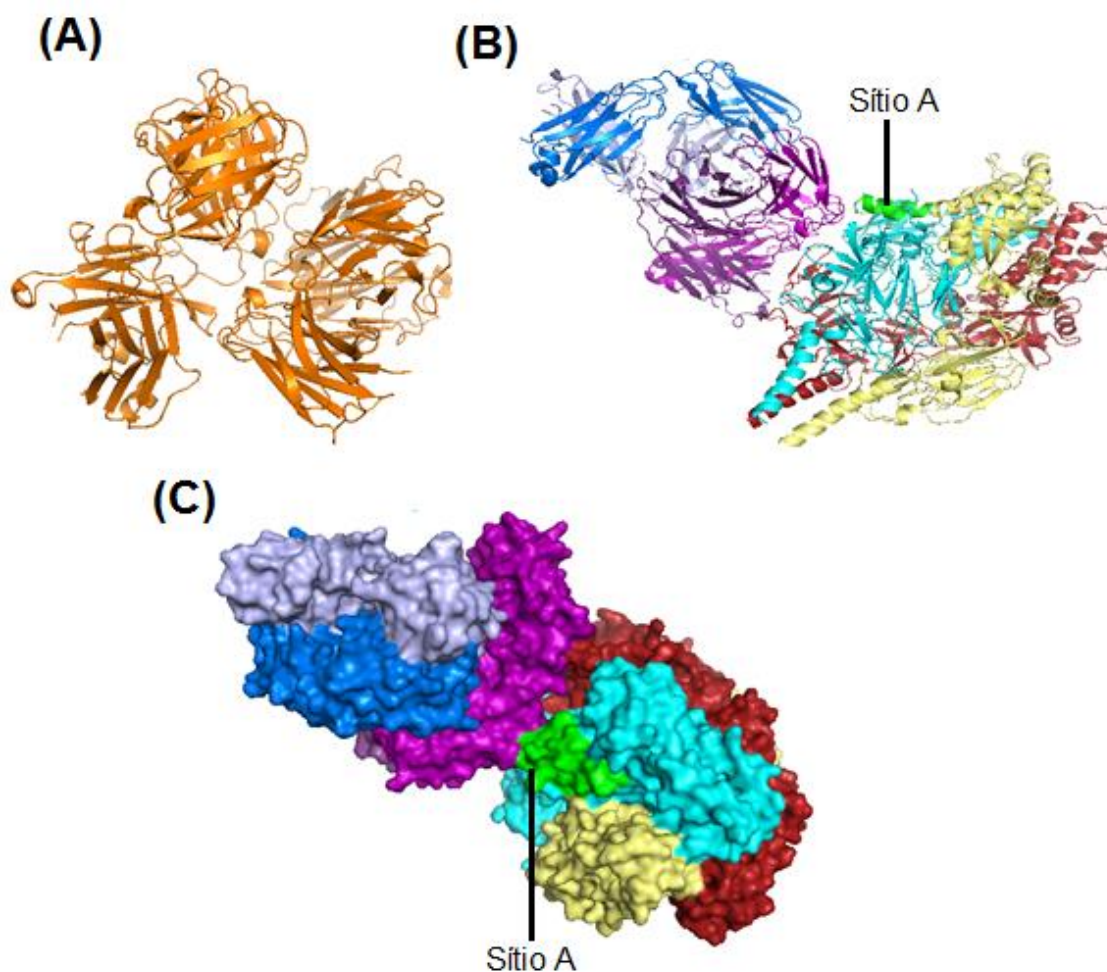


Figura 14. (A) Motavizumab, PDB 3IXT. (B) e (C) Modelo de interação entre a proteína F e o motavizumab, gerado pelo servidor Patchdock e refinado pelo Firedock, em (B) modo cartoon e em (C) modo superfície. A região em verde, corresponde a região de interação entre as duas proteínas.

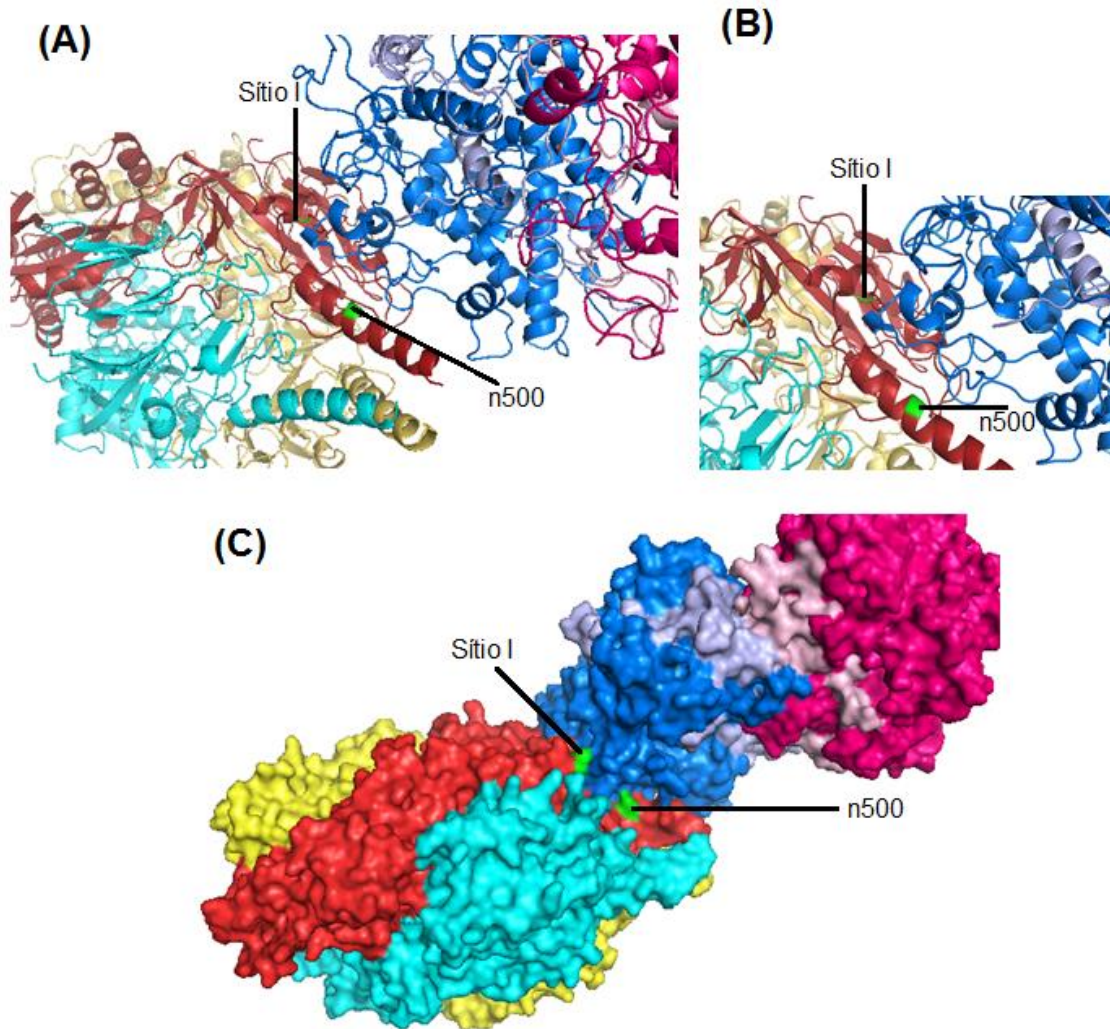


Figura 15. Modelo de interação entre proteína F pré- fusão e mieloperoxidase obtido pelo servidor Patchdock e refinado pelo Firedock. Em (A) e (B) mostrando a região de interação (verde) no sítio I e na região de glicosilação, no modo cartoon e em (C) mostrando as regiões de interação no modo superfície.

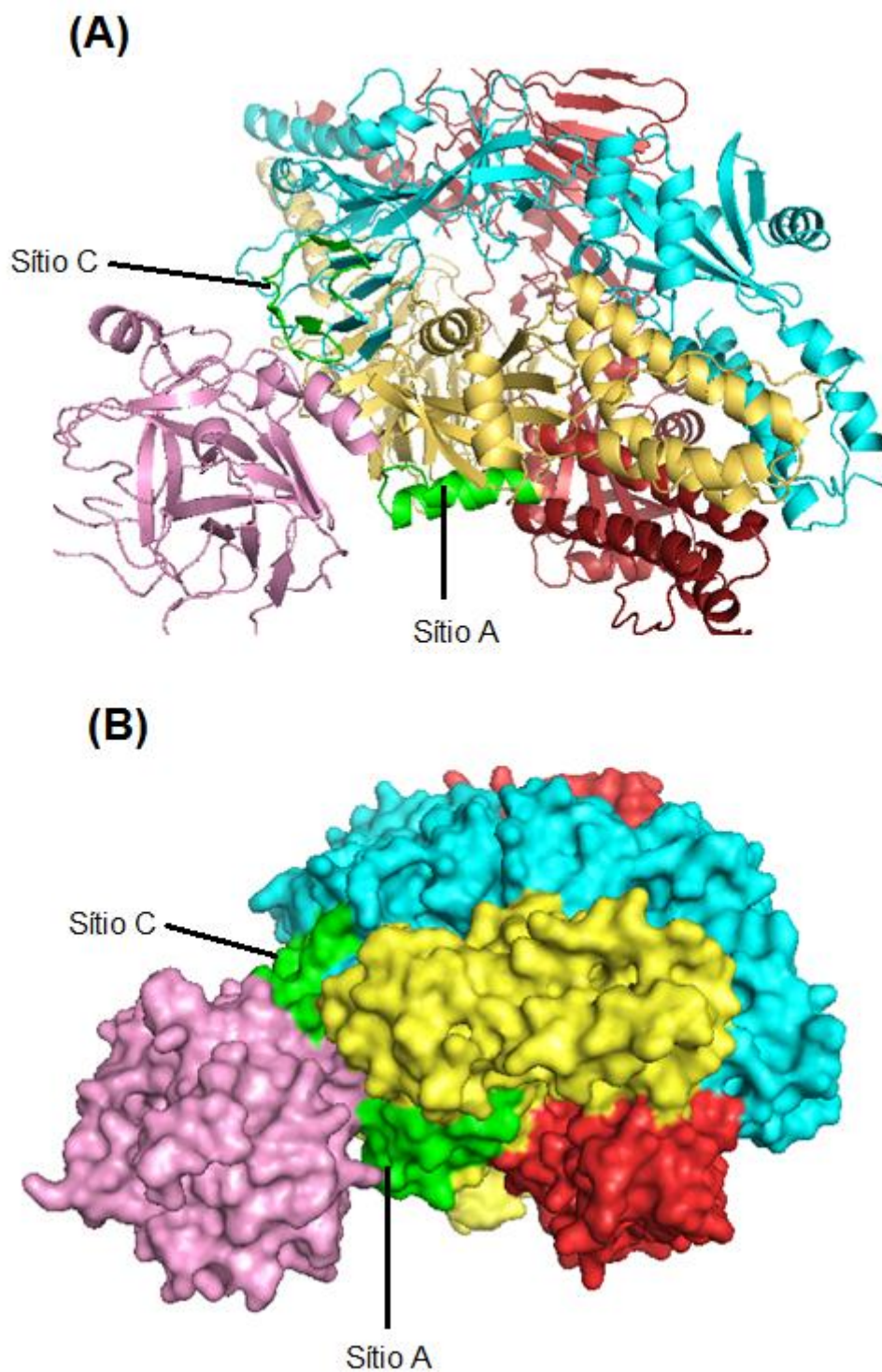


Figura 16. Modelo de interação entre a proteína F pré- fusão e a catepsina G, obtida pelo servidor Patchdock e refinado pelo Firedock. Em (A) mostrando as interações no modo cartoon e em (B) no modo superfície. As regiões de interação (verde) ocorrem no sítio C e no sítio A.

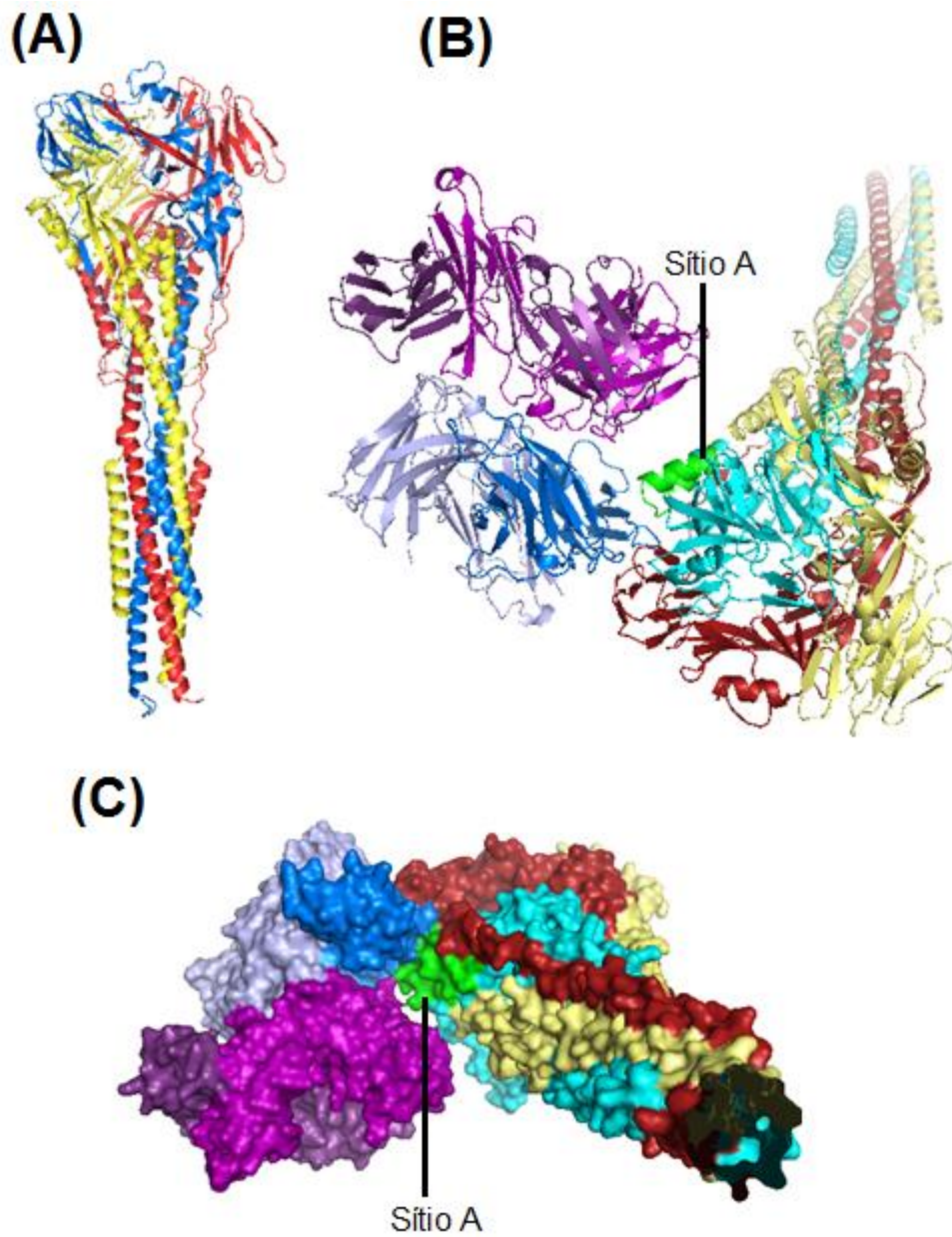


Figura 17. (A) Proteína F pós-fusão, PDB 3RRR. Em (B) e (C) Modelo de interação entre proteína F pós-fusão e motavizumab obtido pelo servidor Patchdock e refinado pelo Firedock, região de interação (verde), no sitio A, sendo em (B) modo de visualização em cartoon e em (C) modo superfície.

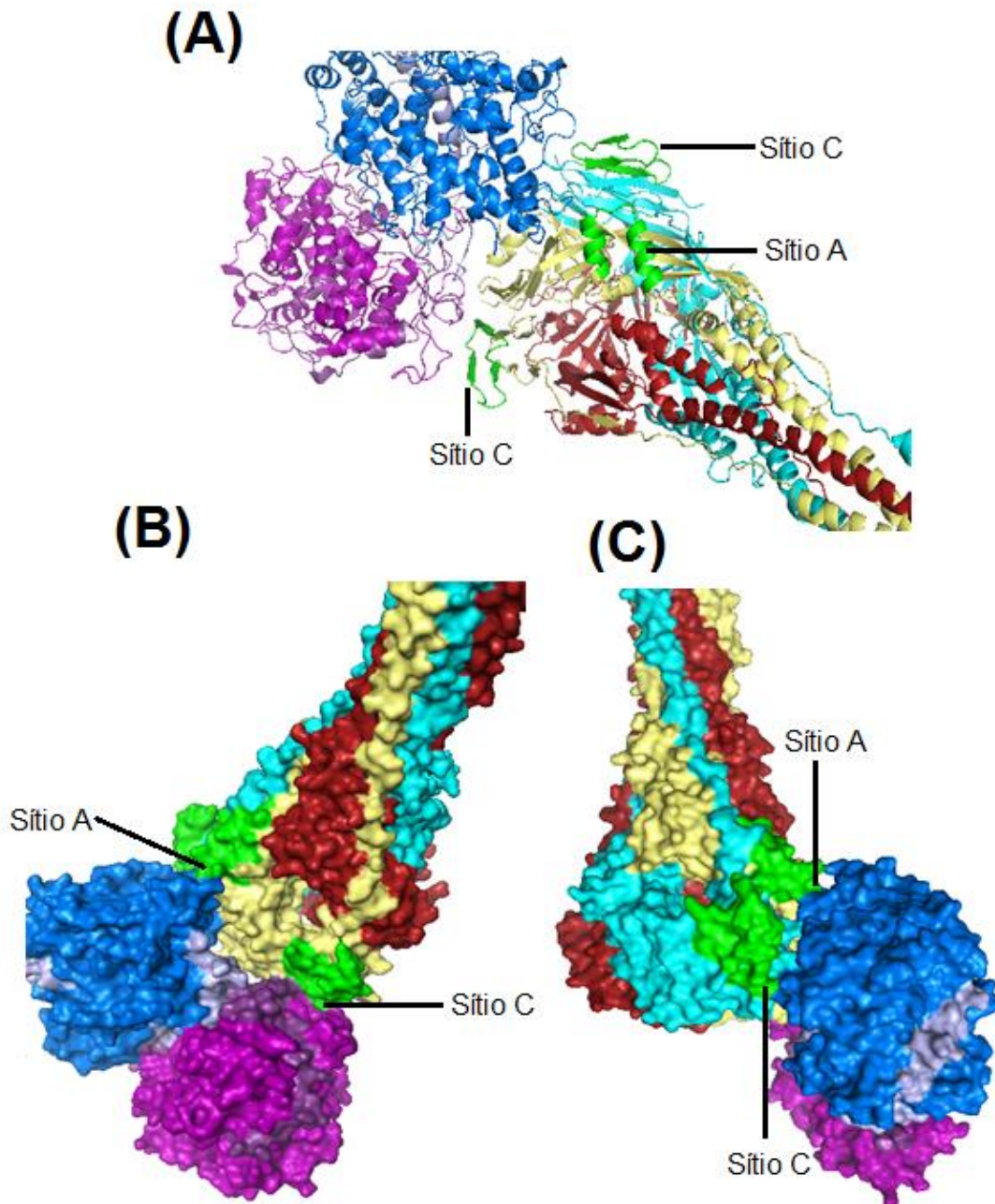


Figura 18. Modelo de interação entre proteína F pós-fusão e mieloperoxidase, obtido pelo servidor Patchdock e refinado pelo Firedock, região de interação (verde), nos sítios C e A. Em (A) modelo de interação dos sítios C e A no modo cartoon e em (B) e (C) no modo superfície.

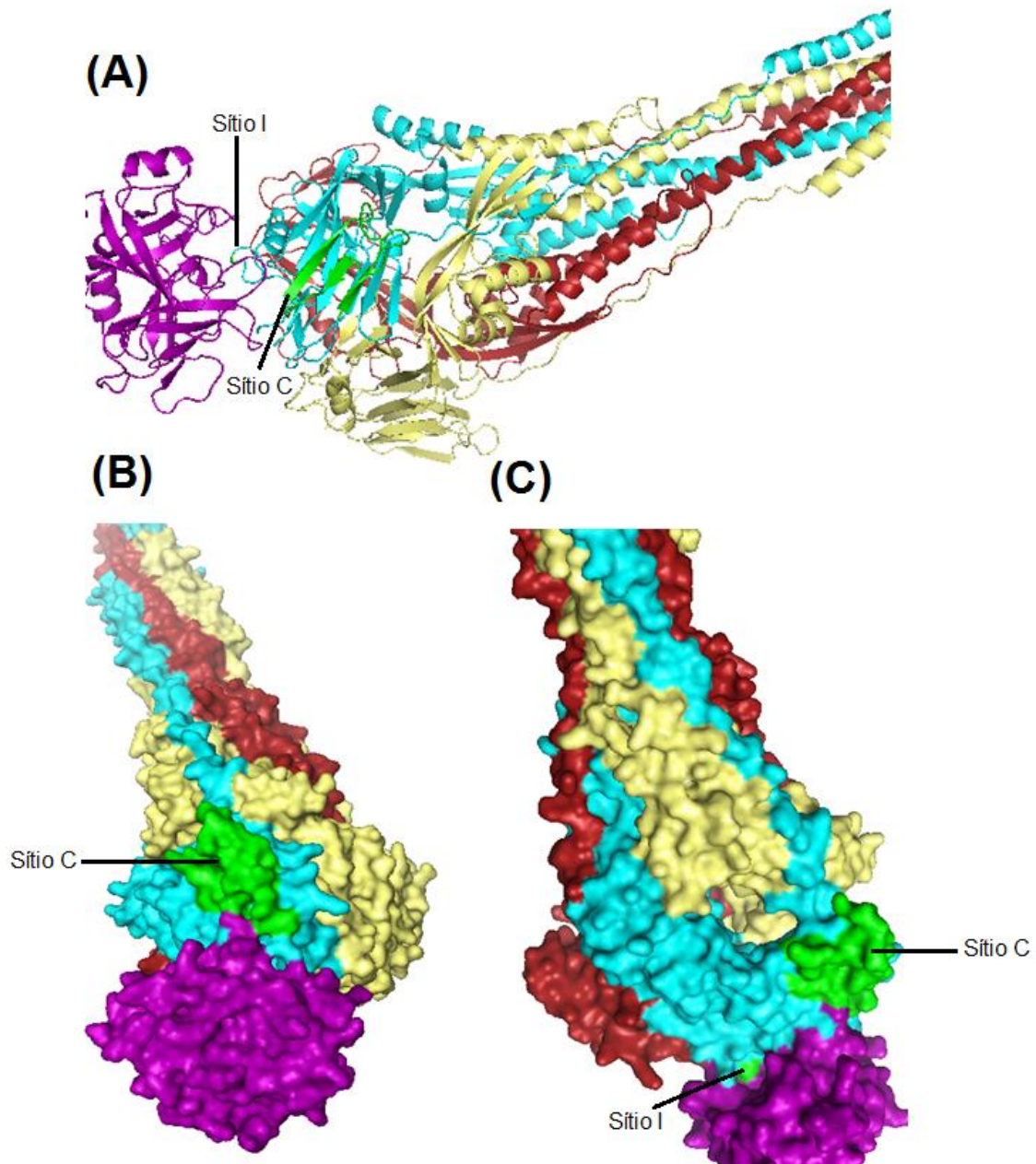


Figura 19. Modelo de interação entre proteína F pós-fusão e catepsina G, obtido pelo servidor Patchdock e refinado pelo Firedock, região de interação (verde), nos sítios C e I. Em (A) modelo de interação dos sítios C e I no modo cartoon e em (B) e (C) no modo superfície

Em resumo, segue abaixo (Tabela 1) os resultados obtidos com o *docking molecular*, utilizados nas análises, tanto para as interações com a proteína F pré-fusão como para a pós-fusão, com a adição das distâncias observadas.

Tabela 1. Dados obtidos pelo *docking molecular* referente às interações com a proteína F- pré e pós fusão.

Interações	Proteína F0/ motavizumab	Proteína F0/ MPO	Proteína F0/ Cat G	Proteína F1/ motavizumab	Proteína F1/ MPO	Proteína F1/ Cat G
Score	13076	12630	13302	11144	12046	13070
Energia de ligação (kcal/mol)	-14,62	-27,84	-26,95	-21,09	-13,06	-26,76
Área de Interação	1772.20	1671.40	1875.30	1384.90	2215.60	1720.60
Distância	II – 2.314; 2.177; 2.473; 2.566	500 – 3.180; 3.188 I – 2.587; 2.567	IV – 2.404; 2.188; 2.384; 2.397 II –2.455; 2.798	II – 2.487; 2.706; 2.351; 2.795	II – 2.401; 2.578; 2.724; 2.962 IV – 2.386; 2.753; 2.800; 2.950; 3.461	IV – 2.007; 2.550; 2.444; 2.555 I – 2.845; 3.239; 3.526

5. DISCUSSÃO

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos do trato respiratório em pacientes infectados por hRSV é bem descrito (EVERARD et al., 1994; SMITH et al., 2001). O contato dos neutrófilos com o hRSV resulta em diversas atividades inflamatórias, inclusive a liberação das NETs via estímulo de receptores TLR (FUNCHAL et al., 2015). Embora as NETs tenham ação microbicida, a presença delas no tecido também tem sido associada com efeitos deletérios durante o progresso de diversas infecções (MASSBERG et al., 2010; NARASARAJU et al., 2011; PAPAYANNOPOULOS; STAAB; ZYCHLINSKY, 2011). Neste estudo, nós demonstramos que o prévio contato das células com as NETs retarda a evolução da infecção *in vitro* pelo hRSV, em células Hep-2, de maneira dose- e carga viral-dependentes. Por outro lado, a presença das NETs apresenta um efeito deletério sobre células já infectadas.

Sampaio et al demonstraram que as NETs possuem ação virucida contra hRSV (*dados não publicados*). As NETs, que apresentaram uma $CC_{50} > 67 \mu M$, foram eficientes em reduzir o dano celular induzido por hRSV em células Hep-2. Os MOIs testados foram 0.1, 0.5 e 1.0, onde apenas o último não foi inibido em ao menos 50% pela ação virucida das NETs. Sampaio et al demonstraram ainda que esta ação virucida poderia ser resultado de uma interação entre algumas proteínas das NETs (elastase e histonas) com a proteína F do vírus.

Num tecido pulmonar, acometido por hRSV, o recrutamento leucocitário ocorrerá posteriormente à chegada do patógeno ao tecido. Os neutrófilos que são a primeira linha de defesa do organismo, atraídos pelos mediadores inflamatórios secretados por células infectadas e por outros leucócitos residentes, encontrarão um cenário de células infectadas e não infectadas e ainda de partículas virais extracelulares. Assim, tivemos por objetivo aqui investigarmos o papel das NETs sobre o curso da infecção do hRSV tanto em células infectadas e não infectadas. Para tanto, nos utilizamos de protocolos que foram denominados de pré- e pós-tratamento.

O processo de liberação das NETs, denominado NETose, foi inicialmente examinado em resposta ao estímulo do mitógeno PMA, um potente indutor de NETs. Infecções microbianas iniciam o processo de NETose e algumas, semelhante ao PMA, ativam a proteína quinase C (PKC), a qual induz

influxo de cálcio intracelularmente e ativação da cascata de sinalização via NADPH oxidase. O resultado final é a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (HAKKIM et al., 2011; KAPLAN; RADIC, 2012). A proteína F do hRSV, à exemplo do PMA, induz liberação de NETs compostas por DNA, elastase e mieloperoxidase, de maneira ROS dependente (FUNCHAL et al., 2015). As NETs geradas neste estudo foram estimuladas por PMA na ausência de SFB, uma vez que este contém DNAses que poderiam degradar nossas redes (VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE; CHOW; NIZET, 2009). Além disso, as NETs foram submetidas à incubação de 24h à 40°C para que o denso enovelado de DNA fosse dissolvido. Nossos resultados demonstraram que nestas condições, mantivemos uma solução homogênea de longos fragmentos de DNA e que ainda continha, aproximadamente 50% da atividade enzimática de mieloperoxidase. Estudos demonstraram uma forte estabilidade de MPO frente a altas temperaturas num curto espaço de tempo. Em incubação da MPO à 75°C por 5 minutos, esta sofreu uma inativação de apenas 10% (OLSEN; LITTLE, 1983). Outro estudo mostrou que a incubação de MPO à 80°C por 15 minutos manteve em 50% a sua atividade residual (BANERJEE et al., 2011). Ao analisarmos outras macromoléculas das NETs, verificamos que as histonas começam a apresentar mudanças na sua estrutura a partir de aproximadamente 65 °C (WEISCHET et al., 1978), enquanto o DNA possui uma temperatura de melting (T_m), temperatura à qual metade da sequência de bases está desnaturada, de 76,2 °C, começando a sofrer desnaturação por volta de 70 °C (WANG; LIM; SON, 2014). A queda de atividade entre NETs incubadas à 25°C e 37-40°C poderia ser reflexo do uso DNase no primeiro caso. A DNase, ao relaxar as fibras de DNA através de sua clivagem, poderia aumentar a disponibilidade de MPO em solução e conseqüentemente melhorar sua resposta enzimática. A atividade enzimática de MPO entre NETs incubadas à 37°C ou à 40°C não apresentou diferença estatística significativa. Este resultado teve uma grande relevância biológica tendo por base a temperatura fisiológica humana de 37°C, aproximando assim nossos resultados das condições existentes *in vivo*.

Neutrófilos exercem um importante papel na imunopatologia durante infecções por hRSV e são continuamente recrutados da medula óssea e fluxo sanguíneo para os pulmões. Cortjens et al (2016) demonstraram que, a despeito

da captura de partículas virais pelas NETs, a formação exagerada das NETs nas vias aéreas contribui para a obstrução pulmonar e agravamento clínico do paciente (CORTJENS et al., 2016b). Em busca dos mecanismos que possam esclarecer esse papel deletério das NETs durante a infecção por hRSV, lançamos mão de uma estratégia combinada de ensaios *in vitro* e *in silico*. Células Hep-2, infectadas com hRSV e tratadas pré- ou posteriormente com diferentes concentrações de NETs, foram monitoradas quanto à taxa metabólica, viabilidade celular, número e extensão de sincícios formados na monocamada.

Células Hep-2, pré-tratadas com diferentes concentrações das NETs, foram infectadas com diferentes inóculos virais (MOIs 0.1, 0.5 e 1.0). Após três dias de cultura, observamos um efeito dose- e inóculo-dependente das NETs sobre a monocamada celular. No menor inóculo testado (MOI 0.1), o pré-tratamento com as NETs (4-16 µg/mL) resultou numa melhora da taxa metabólica e da viabilidade celular, acompanhadas de redução no número e dimensão dos sincícios formados. O efeito benéfico das NETs foi reduzido à medida que o inóculo viral foi aumentado (MOIs 0.5 e 1.0). Nestas condições, observamos queda do número (NETs 8-16 µg/mL) e na dimensão dos sincícios (NETs 0.5-16 µg/mL). No entanto, a taxa metabólica e a viabilidade celular se mantiveram baixas, em níveis comparáveis aqueles apresentados por células que haviam sido infectadas na ausência de qualquer tratamento prévio.

O contato das NETs com células Hep-2 já infectadas resultou em efeitos semelhantes ao pré-tratamento no que diz respeito ao comportamento dose- e inóculo dependentes. Porém, alguns parâmetros foram agravados. A taxa metabólica que apresentava uma tendência de alta frente a um MOI menor (0.1), se manteve próxima dos mesmos níveis proporcionados por controles virais de MOIs mais elevados (0.5 e 1.0). O pós-tratamento das células com concentrações menores de NETs (0.5-4 µg/mL) resultou numa redução no número de sincícios, porém a dimensão destes estava aumentada. Concentrações maiores de NETs (8-16 µg/mL) também reduziram o número de sincícios, mas sempre acompanhada de redução no número de células aderentes nos poços de tratamento. Em resumo, o pós-tratamento trouxe agravamentos no curso da infecção comparado aos efeitos observados no pré-tratamento.

A denominação “Vírus Sincicial Respiratório”, deriva de sua característica de gerar sincícios resultantes da fusão de células infectadas, formando uma célula multinucleada (COLLINS; FEARNES; GRAHAM, 2013). Estudos indicam que o sincício promove um eficiente e rápido mecanismo de disseminação viral célula-célula (ELLIS DUTCH; JARDETZKY; LAMB, 2000; PASTEY et al., 2000). Embora, múltiplas proteínas virais podem ser necessárias para uma indução ótima na formação do sincício, a proteína F é o mediador central deste processo (TECHAARPORNKUL; BARRETTO; PEEPLES, 2001). O tratamento com as NETs, claramente interfere na formação dos sincícios pelas células infectadas pelo hRSV. Células pré-tratadas com NETs tendem a apresentar uma redução no número e na dimensão dos sincícios formados, enquanto que o posterior contato destas células com as NETs, levam a um aumento no tamanho dos sincícios que agora se apresentam em número menor. Tais efeitos podem ser resultado de uma (a) modulação na expressão de proteína F na superfície das células infectadas, (b) alteração na conformação da proteína F expressa ou mesmo (c) ação direta das NETs sobre a proteína F que está na membrana plasmática das células infectadas.

As NETs são compostas por uma grande quantidade e variedade de enzimas que degradam citocinas e quimiocinas via serino proteases (SCHAUER et al., 2014). A proteína F poderia ser um alvo para estas diversas enzimas, dentre elas, elastase, mieloperoxidase, catepsina G, metaloproteinases, proteinase-3, lisozima, colagenase, catalase (DAŁBROWSKA et al., 2016). Resultados *in sílica*, indicam uma possível interação entre as enzimas elastase (Sampaio et al, *dados não publicados*), mieloperoxidase e catepsina-G com a proteína F viral. No entanto, em nenhuma das análises foi detectada interação destas macromoléculas via sítio enzimático que pudesse gerar qualquer tipo de clivagem da proteína F por estas enzimas. Além disso, os ensaios de de pré- e pós-tratamento, apresentaram resultados opostos com relação à dimensão dos sincícios formados, mesmo que, em ambos os protocolos, as NETs estivessem distribuídas extracelularmente e assim, livres para eventuais contatos. Estes dados afastam a possibilidade de que a queda ou o aumento no número de sincícios, observados, respectivamente, em células pré-tratadas e pós-tratadas com as NETs, reflita um efeito direto e enzimático sobre a proteína F do hRSV.

Embora a característica das NETs seja a capacidade de neutralizar e matar agentes patogênicos, muitos estudos tem descrito um papel modulatório das NETs sobre a expressão de determinadas macromoléculas (GARCIA-ROMO et al., 2011; KESSENBROCK et al., 2009; LANDE et al., 2007, 2011; LEFFLER et al., 2012; SANGALETTI et al., 2012). Células dendríticas ativadas por NETs apresentam aumentada produção de interferão de tipo I (GARCIA-ROMO et al., 2011; LANDE et al., 2007, 2011). NETs ativam macrófagos a produzir IL-6, factor de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 β e interleucina-10 (IL-10) (BRAIAN; HOGEA; STENDAHL, 2013; WARNATSCH et al., 2015). Por outro lado, os NETs inibem a ativação de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) pelo lipopolisacarídeo (LPS) e promovem a polarização para uma resposta imune Th2 (BARRIENTOS et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que NETs previnem a diferenciação de DC derivadas de monócitos tratados com IL4-GM-CSF por exercer uma regulação transcripcional do receptor de IL-4 e por digerir aqueles que por ventura foram expressos (GUIMARÃES-COSTA et al., 2017). Estes dados suportam a hipótese de que, a presença das NETs possa interferir de alguma forma com a transcrição, tradução, secreção e/ou expressão da proteína F à partir de células infectadas por hRSV, e assim, afetar o número e a dimensão dos sincícios gerados durante o curso da infecção. Nós não determinamos se as NETs possuem algum efeito direto ou indireto sobre a proteína F. Estudos futuros devem direcionar esta questão que resta em aberto.

A infecção *in vitro* de células pelo hRSV, geralmente resulta em apoptose, considerada não-lítica, o que facilitaria a disseminação das partículas virais (THOMSON, 2001). A formação de sincícios é o principal fator de morte em culturas celulares não-polarizadas, mas *in vivo*, sua formação não é um importante indicativo histopatológico (COLLINS; FEARN; GRAHAM, 2013). Particularmente, em células Hep-2, a infecção por hRSV ativa vias antiapoptóticas nestas, retardando assim a morte celular (KOTELKIN et al., 2003). Neste estudo, a morte celular de células Hep-2 durante o curso da infecção por hRSV foi monitorada através do ensaio de MTT e da coloração por azul de trypan. Respectivamente, estes ensaios possibilitam avaliarmos a taxa metabólica mitocondrial e células em apoptose tardia ou em necrose. A análise combinada destes dois métodos nos permitiu verificar que o prévio

contato das células com as NETs reduz a morte celular de células Hep-2 infectadas pelo vírus hRSV. Este efeito protetor se mostrou mais evidente quando o menor inóculo viral foi testado na presença das maiores concentrações de NETs aqui estudadas ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$). Nós hipotetizamos duas razões para a obtenção de tais resultados. No primeiro cenário, o número de partículas virais disponíveis para infecção viral estaria reduzido em virtude da ação virucida das NETs localizadas sobre a monocamada celular. Num segundo cenário, o contato das NETs com as células, antes da infecção viral, poderia ativar vias antiapoptóticas e/ou reduzir o ciclo viral replicativo e por conseguinte os efeitos nocivos à cultura celular. A ativação das vias antiapoptóticas foi descartada por nós uma vez que outros estudos demonstram o efeito citotóxico das NETs em mais de 50% de células endoteliais e epiteliais (SAFFARZADEH et al., 2012). Dentre os componentes das NETs, a adição de LL-37 demonstrou efeito antiviral contra HIV por inibir a atividade intracelular de proteases e da transcriptase reversa (BERGMAN et al., 2007; WONG et al., 2011). Em estudos envolvendo RSV, LL-37 é internalizada e retida por células Hep-2 as quais adquire um estado antiviral e reduzida replicação do vírus (LAU et al., 2005). Em conjunto, estes dados reforçam a ideia de que o efeito virucida das NETs associado a uma possível interferência nas etapas intracelulares do ciclo replicativo do hRSV, seriam, ao menos parcialmente, responsáveis pela proteção induzida pelas NETs sobre células não infectadas.

Kotelkin et al (2003), demonstraram que a infecção pelo vírus hRSV sensibiliza as células à morte por apoptose através da modulação na expressão de fatores pró-apoptóticos da família Bcl-2 e caspases, bem como fatores anti-apoptóticos, especialmente Mcl-1 (KOTELKIN et al., 2003). Embora os autores tenham tido dificuldade em reproduzir tais efeitos nas células Hep-2, células A549 se mostraram um bom modelo para tais estudos. Nós apresentamos aqui que, o posterior contato de células já infectadas com NETs ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$) resulta em intensa morte celular, evidenciada pela redução no número de células aderentes no poço. Apesar das análises microscópicas, por vezes, os dados de MTT se mostraram contraditórios, principalmente nas concentrações de NET 16 $\mu\text{g/mL}$ onde, visivelmente havia aumento na leitura de MTT concomitante a uma intensa redução no número de células. O MTT é um sal metabolizado pelas

mitocôndrias de células vivas que geram cristais de formazan (SLATER; SAWYER; STRÄULI, 1963). Embora, o uso do MTT como uma medida indireta da viabilidade celular seja bem aceito, diversos estudos tem chamado à atenção sobre a interpretação dos seus resultados (BERNHARD et al., 2003; JABBAR; TWENTYMAN; WATSON, 1989; PAGLIACCI et al., 1993). Estes estudos demonstram que a metabolização do sal de MTT pode ser aumentada em células que se encontram numa fase pré-apoptótica, onde houve inibição do ciclo celular. Nestas condições, as células apresentam aumento do volume celular, do número e da atividade mitocondrial. Assim, a combinação de mais de um método para avaliarmos o impacto das NETs sobre o curso da infecção *in vitro* pelo hRSV, nos permite dizer que o pré-tratamento das células tem um efeito benéfico dose- e carga viral dependentes, enquanto que o posterior contato com as NETs é deletério para células já infectadas.

A captura de partículas virais pelas NETs mostrou reduzir a infectividade em culturas de células *in vitro*, sugerindo que as NETs podem contribuir para limitar a disseminação de diversas doenças virais (BRADLEY et al., 2012; CORTJENS et al., 2016b; GALANI; ANDREAKOS, 2015; LINDEMANS et al., 2006; SAITOH et al., 2012b). A ligação viral às NETs provavelmente é influenciada pela carga elétrica positiva das histonas, uma das principais proteínas (70%) presentes nas NETs (JENNE; KUBES, 2015), causando atração de vírion carregados negativamente. O vírus sincicial respiratório (RSV), um agente patogênico típico em lactentes e crianças pequenas, induz a NETosis (FUNCHAL et al., 2015) dependente de TLR-4 e o aprisionamento de RSV nas fibras das NETs resulta em menor infecção viral de células cultivadas *in vitro* (CORTJENS et al., 2016b).

Ferramentas de bioinformática devem ser usadas como complementaridade aos testes experimentais (VERLI, 2014). Neste trabalho, a bioinformática foi utilizada para complementar os resultados obtidos e enriquecer o estudo. A interação de duas proteínas das NETs, mieloperoxidase e catepsina-G, com a proteína de fusão do hRSV, foi investigada. Para tanto, foram realizadas análises de *docking molecular* via servidor Patchdock que avalia possíveis atracamentos de macromoléculas consideran-se sua complementaridade estrutural. Por ser um servidor que realiza interações

proteína-proteína ou proteína-ligante como corpo rígido (SCHNEIDMAN-DUHOVNY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004), foi necessário um refinamento dos dados no servidor Firedock, de modo que a flexibilidade das macromoléculas fosse incluída na análise (ANDRUSIER; NUSSINOV; WOLFSON, 2007; MASHIACH et al., 2008).

A proteína F do hRSV é responsável pela fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira, e é um estágio crucial no ciclo de vida de todo vírus envelopado, pois é necessária para facilitar a deposição do genoma viral intracelularmente para que este se replique (LAMB, 1993). Promove ainda, a fusão da membrana de células infectadas com as células adjacentes, formando os sincícios (WERTZ et al., 1985), além de estimular a liberação das NETs (FUNCHAL et al., 2015). A resposta neutralizante dos anticorpos em relação ao hRSV é predominantemente direcionada à proteína F em sua forma de pré-fusão. No entanto, a partícula infecciosa de hRSV possui também em sua superfície proteína F em sua forma de pós-fusão (LILJEROOS et al., 2013; MCLELLAN, 2015). A proteína mieloperoxidase (MPO) é o principal componente encontrado nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos (SCHULTZ; KAMINKER, 1962; SEGAL, 2005; SEO et al., 2011). Ela é uma heme-enzima, pró-inflamatória, compreendendo 5% das proteínas totais dos neutrófilos e 25% das proteínas granulares (SEGAL, 2005). MPO está envolvida no processo de formação das NETs (VOROBEVA; PINEGIN, 2014) e tem propriedades antivirais (MANDA et al., 2014; SAITOH et al., 2012b). Catepsina G tem função antimicrobiana (ZAWROTNIAK; RAPALA-KOZIK, 2013) e é capaz de clivar fatores de virulência de patógenos (VOROBEVA; PINEGIN, 2014).

Apesar das estruturas da proteína F pré e pós fusão terem conformações diferentes, elas compartilham aproximadamente 50% de suas áreas de superfície, incluindo dois sítios antigênicos bem definidos (II e IV), que tem neutralização moderada. Presentes unicamente na superfície pré-F, há relatado na literatura, ao menos de três sítios antigênicos (\emptyset , III e V) que são de alta neutralização, principalmente o sítio \emptyset . Anticorpos que se ligam ao sítio antigênico I tem fraca ou nenhuma atividade de neutralização e ligam-se quase que exclusivamente à proteína F-pós fusão (KILLIKELLY; KANEKIYO; GRAHAM, 2016b). Nossos resultados apresentaram boas energias de ligação

em sítios importantes, tanto na proteína F pré como na pós fusão, sugerindo que há possibilidade de interação entre ambas formas da proteína F com a mieloperoxidase e a catepsina G. Além de terem apresentado uma ampla superfície de contato e estarem próximas de aminoácidos correspondentes a sítios importantes da proteína F. A interação das proteínas das NETs com a proteína F poderia implicar em uma ação antiviral dessas proteínas, ao bloquear etapas importantes da infecção viral, como adesão e fusão dos virions às células.

Apesar do potencial papel microbicida das NETs na imunidade inata do hospedeiro acometido por uma doença viral, esta proteção pode ser facilmente sobreposta por dano generalizado. Durante as doenças respiratórias, a injúria e a obstrução pulmonar seriam os dois principais fatores responsáveis por tais danos. Saffarzadeh et al. mostraram que a formação das NETs induz morte de células epiteliais e endoteliais *in vitro* (SAFFARZADEH et al., 2012), sugerindo um efeito citotóxico direto das NETs mediado pelas histonas e mieloperoxidase, mas não por elastase. Uma severa obstrução aérea causada por muco rico em DNA é uma importante característica da bronquiolite aguda em crianças infectadas por RSV. NETs foram detectadas no lavado broncoalveolar destes pacientes (CORTJENS et al., 2016b). Neste mesmo trabalho, análises histopatológicas das vias aéreas de bezerros com severa infecção por RSV mostraram uma obstrução generalizada por meio de muco rico em mucinas, restos celulares e NETs (CORTJENS et al., 2016b).

Vários modelos experimentais tem descrito um efeito benéfico na diminuição da permeabilidade pulmonar, melhora nas trocas gasosas e mesmo mortalidade do hospedeiro ao utilizar estratégias que inibam ou degradem as NETs. Nestes trabalhos, foram testados anticorpos bloqueadores de histonas ou inalação de DNase (CAUDRILLIER et al., 2012; ROSSAINT et al., 2014; THOMAS et al., 2012). Especificamente para casos de hRSV, a inalação de DNase em crianças com quadros de bronquiolite reduz o colapso pulmonar, mas a terapia não apresentou comprovação de benefícios clínicos quando comparada a pacientes com bronquiolite leve (BOOGAARD et al., 2007; NASR et al., 2001). Embora o tratamento com Dnase possa reduzir os efeitos adversos de NETs, é importante perceber que a degradação delas também pode ter consequências indesejadas nos pulmões. *In vitro*, a digestão de NETs por

nucleases, como DNase ou MNase (nuclease microcócica), não reduz sua citotoxicidade (SAFFARZADEH et al., 2012), sugerindo que a ação prejudicial das proteínas das NETs independa delas estarem presas ou não às fibras de DNA. A liberação destas proteínas no meio extracelular pode ainda resultar em danos teciduais mais distantes, o que traria consequências sistêmicas. Da mesma forma, a digestão as NETs também contribuiria para a disseminação de agentes patogênicos nela capturados (O'DONNELL et al., 1998).

6. CONCLUSÃO

O conjunto dos dados aqui apresentados nos permite propor um mecanismo mais detalhado sobre a delicada e equilibrada ação das NETs durante o curso da infecção por hRSV. Células infectadas, ao secretarem partículas virais e diversos mediadores inflamatórios, promovem um contínuo e crescente recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Neutrófilos ativados pelo estímulo do próprio hRSV e por agentes inflamatórios endógenos secretam NETs. Inicialmente, a presença de quantidades reduzidas de NETs auxilia na proteção antiviral das células não-infectadas, atuando na captura de partículas virais e intervindo na disseminação viral. Paralelamente, a massiva produção de NETs e seu acúmulo no tecido inflamado, rompe com a barreira dos efeitos benéficos das NETs. Passam a predominar, os danos citotóxicos e deletérios das NETs em sinergismos com a morte celular induzida pelo vírus.

Em acordo com vários outros autores, nós sugerimos que estratégias farmacológicas sejam desenhadas no sentido de modular a formação e a composição das NETs no tecido pulmonar inflamado, visando obter uma ação antiviral mais efetiva com redução dos danos teciduais. Neste sentido, nos parece mais promissor o uso de drogas/anticorpos bloqueadores de algumas proteínas das NETs, como histonas e MPO.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-HARB, M. et al. IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. **European Respiratory Journal**, v. 14, n. 1, p. 139–143, 1999.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. **Pathogen recognition and innate immunity**Cell, 2006.

ANDERSON, L. J. et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 151, n. 4, p. 626–633, 1985.

ANDRUSIER, N.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 69, n. 1, p. 139–159, 2007.

ARBIZA, J. et al. Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 9, p. 2225–2234, 1992.

ARNOLD, R.; KONIG, W. Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively intercellular adhesion molecule-1 expression. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7359–7367, 2005.

BANERJEE, S. et al. Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 2, p. 375–387, 2011.

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

BARRIENTOS, L. et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 11, p. 5689–5698, 2014.

BAWAGE, S. S. et al. Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. **Adv Virol**, v. 2013, p. 595768, 2013.

BERGMAN, P. et al. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. **Current HIV Research**, v. 5, n. 4, p. 410–415, 2007.

BERMINGHAM, A.; COLLINS, P. L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p. 11259–11264, 1999.

BERNHARD, D. et al. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 195, n. 2, p. 193–199, 2003.

BONFIM, C. M. et al. Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers. **Jornal de pediatria**, v. 87, n. 5, p. 439–444, 2011.

BOOGAARD, R. et al. Recombinant human deoxyribonuclease in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Chest**, v. 131, n. 3, p. 788–795, 2007.

BOSSERT, B.; CONZELMANN, K.-K. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. **Journal of virology**, v. 76, n. 9, p. 4287–93, 2002.

BOSSERT, B.; MAROZIN, S.; CONZELMANN, K.-K. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. **Journal of virology**, v. 77, n. 16, p. 8661–8, 2003.

BRADLEY, L. M. et al. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

BRAIAN, C.; HOGEA, V.; STENDAHL, O. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, n. 6, p. 591–602, 2013.

BRILL, A. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 10, n. 1, p. 136–44, 2012.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria Brinkmann Science 2004.pdf. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532–5, 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 577–582, 2007.

BUENO, S. M. et al. Host immunity during RSV pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1320–1329, 2008.

BUKREYEV, A et al. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 8973–8982, 1997.

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

CAUDRILLIER, A. et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2661–71, 2012.

CHANOCK, R. et al. Respiratory Syncytial Virus: Virus recover and other

observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. **JAMA: the journal of ...**, 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 (Baltimore)**, v. 85, n. 5, p. 278–287, 2006.

CHENG, X. et al. Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 13943–13952, 2005.

CLARK, S. R. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nature Medicine**, v. 13, n. 4, p. 463–469, 2007.

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

COLLINS, P. L.; FEARNES, R.; GRAHAM, B. S. Respiratory syncytial virus: Virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 3–38, 2013.

COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. **The Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2040–2055, 2008.

COLLINS, P. L.; MOTTET, G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 7, p. 1445–1450, 1993.

CONRAD, D. A. et al. Aerosolized ribavirin treatment of respiratory syncytial virus infection in infants hospitalized during an epidemic. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 2, p. 152–158, 1987.

CORNELI, H. M. et al. A Multicenter, Randomized, Controlled Trial of Dexamethasone for Bronchiolitis. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 4, p. 331–339, 2007.

CORTJENS, B. et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. **The Journal of pathology**, v. 238, n. 3, p. 401–11, 2016a.

CORTJENS, B. et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. **The Journal of pathology**, v. 238, n. 3, p. 401–11, 2016b.

COSTELLO, H. M. et al. Targeting RSV with vaccines and small molecule drugs. **Infectious disorders drug targets**, v. 12, n. 2, p. 110–28, 2012.

COUCH, R. B.; ENGLUND, J. A.; WHIMBEY, E. Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. **The American journal of medicine**, v. 102, n. 3A, p. 2-9–6, 1997.

COXON, A. et al. A novel role for the β 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: A homeostatic mechanism in inflammation. **Immunity**, v. 5, n. 6, p. 653–666, 1996.

D.W., S. et al. A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 1, p. 24–29, 1991.

DAŁBROWSKA, D. et al. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. **Scandinavian journal of immunology**, 2016.

DENIS LH KASPER, E BRAUNWALD, AS FAUCI, SL HAUSER, DL LONGO, J. L. J. Influenza: Harrison's principles of internal medicine. In: **Harrison's principles of internal medicine**. [s.l.: s.n.].

DOBSON, J. V et al. The use of albuterol in hospitalized infants with bronchiolitis. **Pediatrics**, v. 101, n. 3 Pt 1, p. 361–368, 1998.

DRESCHER, B.; BAI, F. **Neutrophil in viral infections, Friend or foe?Virus Research**, 2013.

DUBOIS, A. V. et al. Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 80–86, 2012.

DUDAS, R. A.; KARRON, R. A. Respiratory syncytial virus vaccines. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 430–9, 1998.

DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. **Algorithms in Bioinformatics**, p. 185–200, 2002.

DUPUY, L. C. et al. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. **Journal of virology**, v. 73, n. 10, p. 8384–8392, 1999.

DWYER, M. et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 6, p. 765–779, 2014.

ELLIS DUTCH, R.; JARDETZKY, T. S.; LAMB, R. A. **Virus membrane fusion proteins: Biological machines that undergo a metamorphosisBioscience Reports**, 2000.

- EMBORIADOU, M. et al. Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 37, n. 1, p. 79–84, 2007.
- ENGLUND, J. A. et al. Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, n. 3, p. 203–208, 1988.
- EVERARD, M. L. et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. **Archives of disease in childhood**, v. 71, n. 5, p. 428–32, 1994.
- FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. **N Engl J Med**, v. 352, p. 1749–59, 2005.
- FALSEY, A. R.; FORMICA, M. A.; WALSH, E. E. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: Comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 817–820, 2002.
- FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 3, p. 371–84, 2000.
- FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Viral pneumonia in older adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 4, p. 518–524, 2006.
- FEARNS, R.; COLLINS, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5852–64, 1999.
- FIGUEIREDO, L. T. M. **Pneumonias virais: aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento** *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2009.
- FLORES, G.; HORWITZ, R. I. Efficacy of beta2-agonists in bronchiolitis: a

reappraisal and meta-analysis. **Pediatrics**, v. 100, n. 2 Pt 1, p. 233–239, 1997.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007.

FUCHS, T. A. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 36, p. 15880–15885, 2010.

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

GALANI, I. E.; ANDREAKOS, E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 4, p. 557–564, 2015.

GARCIA-ROMO, G. S. et al. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, p. 73ra20-73ra20, 2011.

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

GLEZEN, W. P. et al. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **Am J Dis Child**, v. 140, n. 6, p. 543–546, 1986.

GOH, C. S.; MILBURN, D.; GERSTEIN, M. Conformational changes associated with protein-protein interactions. **Curr Opin Struct Biol**, v. 14, n. 1, p. 104–109, 2004.

GONZÁLEZ-REYES, L. et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 98, n. 17, p. 9859–64, 2001.

GOWER, T. L. et al. RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. **Journal of virology**, v. 79, n. 9, p. 5326–5336, 2005.

GRABCANOVIC-MUSIJA, F. et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 59, 2015.

GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 277–319, 2017.

GROSKREUTZ, D. J. et al. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 3, p. 1733–40, 2006.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Neutrophil extracellular traps reprogram IL-4/GM-CSF-induced monocyte differentiation to anti-inflammatory macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, 2017.

GUPTA, C. K. et al. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. **Vaccine**, v. 14, n. 15, p. 1417–1420, 1996a.

GUPTA, C. K. et al. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV

vaccines and immune globulin. **Vaccine**, v. 14, n. 15, p. 1417–1420, 1996b.

HACKING, D.; HULL, J. **Respiratory syncytial virus - Viral biology and the host response****Journal of Infection**, 2002.

HAKKIM, A. et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2011.

HALL, C. B. et al. Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial viral infection. A controlled double-blind study in young adults. **JAMA**, v. 249, n. 19, p. 2666–2670, 1983.

HALL, C. B. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 25, p. 1917–1928, 2001.

HALL, C. B.; DOUGLAS, R. G. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. **The Journal of Pediatrics**, v. 99, n. 1, p. 100–103, 1981.

HALL, C. B.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 6, p. 792–796, 2001.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **British medical bulletin**, v. 53, n. 3, p. 669–83, 1997.

HENDERSON, F. W. et al. Respiratory-Syncytial-Virus Infections, Reinfections and Immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 300, n. 10, p. 530–534, 1979.

HORNSLETH, A.; LOLAND, L.; LARSEN, L. B. Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, n. 2, p. 163–170, 2001.

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

HUANG, S. Y. **Search strategies and evaluation in protein-protein docking: Principles, advances and challenges** **Drug Discovery Today**, 2014.

J. F. R. KERR*, A. H. W. A. A. R. CURRIE. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, n. 6, p. 479–517, 1972.

JABBAR, S. A; TWENTYMAN, P. R.; WATSON, J. V. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. **British journal of cancer**, v. 60, n. 4, p. 523–528, 1989.

JAMALUDDIN, M. et al. IFN-beta mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 280, n. 2, p. L248-57, 2001.

JAOVISIDHA, P. et al. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, p. 2816–2820, 1999.

JENNE, C. N. et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 2, p. 169–180, 2013.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Virus-induced NETs--critical component of host defense or pathogenic mediator? **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004546, 2015.

JIN, H. et al. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. **Virology**, v.

273, n. 1, p. 210–218, 2000.

JOHNSON, S. et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus.

The Journal of infectious diseases, v. 176, n. 5, p. 1215–24, 1997.

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

KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 2012.

KARRON, R. A. et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 13961–6, 1997.

KESSENBROCK, K. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. **Nature Medicine**, v. 15, n. 6, p. 623–625, 2009.

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

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

KIM, J. Y.; CHANG, J. **In hot pursuit of the first vaccine against respiratory syncytial virus** *Yonsei Medical Journal*, 2016.

KOTELKIN, A. et al. Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to

apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Journal of virology**, v. 77, n. 17, p. 9156–72, 2003.

KOUPENOVA, M. et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 791–802, 2014.

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

LAMB, R. A. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 1–11, 1993.

LANDE, R. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 564–569, 2007.

LANDE, R. et al. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, p. 73ra19-73ra19, 2011.

LANGLEY, J. M. et al. Nosocomial Respiratory Syncytial Virus Infection in Canadian Pediatric Hospitals: A Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada Study. **Journal of Pediatrics**, v. 131, p. 113–7., 1997.

LAU, Y. E. et al. Interaction and Cellular Localization of the Human Host Defense Peptide LL-37 with Interaction and Cellular Localization of the Human Host Defense Peptide LL-37 with Lung Epithelial Cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 583–591, 2005.

LEFFLER, J. et al. Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3522–3531, 2012.

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

LEUNG, A. K. C.; KELLNER, J. D.; DAVIES, H. D. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. **J Natl Med Assoc**, v. 97, n. 12, p. 1708–13, 2005.

LILJEROOS, L. et al. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11133–11138, 2013.

LINDEMANS, C. A et al. Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 176, n. 9, p. 5529–5537, 2006.

LIU, P. et al. Retinoic Acid-Inducible Gene I Mediates Early Antiviral Response and Toll-Like Receptor 3 Expression in Respiratory Syncytial Virus-Infected Airway Epithelial Cells. **Journal of Virology**, v. 81, n. 3, p. 1401–1411, 2007.

LO, M. S.; BRAZAS, R. M.; HOLTZMAN, M. J. Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha/Beta Interferon Responsiveness. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 9315–9319, 2005.

LUQUE, L. E.; RUSSELL, C. J. Spring-loaded heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. **Journal of virology**, v. 81, n. 7, p. 3130–41, 2007.

MANDA, A. et al. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. **Cent Eur J Immunol**, v. 39, n. 1, p. 116–121, 2014.

MANZENREITER, R. et al. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. **Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 11, n. 2, p. 84–92, 2012.

MASHIACH, E. et al. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W229-32, 2008.

MASSBERG, S. et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. **Nature Medicine**, v. 16, n. 8, p. 887–896, 2010.

MCLELLAN, J. S. et al. Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. **Journal of Virology**, v. 85, n. 15, p. 7788–7796, 2011.

MCLELLAN, J. S. Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. **Current Opinion in Virology**, v. 11, p. 70–75, 2015.

MCLELLAN, J. S.; CHEN, M.; KIM, A. et al. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. *Nature structural & molecular biology*, 2010, 17(2):248-250.

MCLELLAN, J. S.; RAY, W. C.; PEEPLES, M. E. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 83–104, 2013.

MEJÍAS, A. et al. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 24, n. 11 Suppl, p. S189–S196, NaN-S197, 2005.

MEJÍAS, A.; RAMILO, O. Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 2, n. 3, p. 433–439, 2008.

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

MONTEIRO, C. C.; DEZANET, L. N. C.; FRANÇA, E. B. Monitoring respiratory virus infection in the metropolitan area of Belo Horizonte, Brazil, 2011-2013.

Epidemiol. Serv. Saúde, v. 25, n. 5, p. 233–242, 2016.

MOORTHY, A. N. et al. In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAR, 2013.

MORIN, B. et al. The polymerase of negative-stranded RNA viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 2, p. 103–110, 2013.

NAJMEH, S. et al. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. **Journal of Visualized Experiments**, n. 98, p. 353025, 2015.

NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, 2011.

NASR, S. Z. et al. Efficacy of recombinant human deoxyribonuclease I in the hospital management of respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Chest**, v. 120, n. 1, p. 203–8, 2001.

O'DONNELL, A. E. et al. Treatment of idiopathic bronchiectasis with aerosolized recombinant human DNase I. **Chest**, v. 113, n. 5, p. 1329–1334, 1998.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatr Respir Rev**, v. 5 Suppl A, p. S119-26, 2004.

OLSEN, R. L.; LITTLE, C. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. **The Biochemical journal**, v. 209, n. 3, p. 781–7, 1983.

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

PAES, B. A. et al. **A decade of respiratory syncytial virus epidemiology and prophylaxis: Translating evidence into everyday clinical practice** *Canadian Respiratory Journal*, 2011.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.

PAGLIACCI, M. C. et al. Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. **European Journal of Cancer**, v. 29, n. 11, p. 1573–1577, 1993.

PANG, I. K.; IWASAKI, A. **Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus** *Trends in Immunology*, 2011.

PAPAYANNOPOULOS, V.; STAAB, D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving dnase therapy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

PARAMORE, L. C. et al. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: An analysis of national databases. **PharmacoEconomics**, v. 22, n. 5, p. 275–284, 2004.

PASTEY, M. K. et al. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 35–40, 2000.

PILSCZEK, F. H. et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7413–7425, 2010.

RAJAN, D. et al. Response to rhinovirus infection by human airway epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells in an in vitro two-chamber tissue culture system. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66600, 2013.

RASMUSSEN, L. et al. A high-throughput screening strategy to overcome virus instability. **Assay and drug development technologies**, v. 9, n. 2, p. 184–190, 2011.

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

Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., Wang, L., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Pneumoviridae*, *Journal of General Virology*, (In Press).

ROSSAINT, J. et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. **Blood**, v. 123, n. 16, p. 2573–2584, 2014.

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

RZEPKA, J. P.; HAICK, A. K.; MIURA, T. A. Virus-infected alveolar epithelial cells direct neutrophil chemotaxis and inhibit their apoptosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 833–841, 2012.

SAFFARZADEH, M. et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

SAITOH, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense

Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012a.

SAITOH, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012b.

SANGALETTI, S. et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3007–3018, 2012.

SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 511–517, 2014.

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

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Predicting molecular interactions in silico: II. Protein-protein and protein-drug docking. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 1, p. 91–107, 2004.

SCHOEN, P. et al. Inhibition of influenza virus fusion by polyanionic proteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 7, p. 995–1003, 1997.

SCHULTZ, J.; KAMINKER, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 96, n. 3, p. 465–467, 1962.

SEGAL, A. W. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 197–223, 2005.

SEO, S. U. et al. Type I interferon signaling regulates Ly6Chi monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.

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

SHAK, S. et al. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 23, p. 9188–92, 1990.

SHORT, K. R. et al. Antibodies mediate formation of neutrophil extracellular traps in the middle ear and facilitate secondary pneumococcal otitis media. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 1, p. 364–370, 2014.

SIMOES, E. A. Respiratory syncytial virus infection. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 847–852, 1999.

SIMON, A. et al. Nosocomial infection: A risk factor for a complicated course in children with respiratory syncytial virus infection - Results from a prospective multicenter German surveillance study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n. 3–4, p. 241–250, 2008.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRÄULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 77, p. 383–393, 1963.

SMITH, G. R.; STERNBERG, M. J. E. **Prediction of protein-protein interactions by docking methods** *Current Opinion in Structural Biology*, 2002.

SMITH, P. K. et al. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 37, n. 2, p. 146–151,

2001.

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

SPANN, K. M.; TRAN, K. C.; COLLINS, P. L. Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF- κ B, and Proinflammatory Cytokines. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5353–5362, 2005.

SPEHNER, D.; DRILLIEN, R.; HOWLEY, P. M. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 260–8, 1997.

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

STEC, D. S.; HILL, M. G.; COLLINS, P. L. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 273–287, 1991.

STOKES, C. A. et al. Role of interleukin-1 and MyD88-dependent signaling in rhinovirus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 15, p. 7912–21, 2011.

STOKES, K. L. et al. The respiratory syncytial virus fusion protein and neutrophils mediate the airway mucin response to pathogenic respiratory syncytial virus infection. **J Virol**, v. 87, n. 18, p. 10070–82, 2013.

STOPPELENBURG, A. J. et al. Elevated Th17 response in infants undergoing

respiratory viral infection. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 5, p. 1274–1279, 2014.

SUBRAMANIAN, K. N. et al. Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 17, n. 2, p. 110–115, 1998.

TATE, M. D. et al. Neutrophils Ameliorate Lung Injury and the Development of Severe Disease during Influenza Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7441–7450, 2009.

TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M. E. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. **Journal of virology**, v. 75, n. 15, p. 6825–34, 2001.

TENG, M. N.; WHITEHEAD, S. S.; COLLINS, P. L. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. **Virology**, v. 289, n. 2, p. 283–296, 2001.

THOMAS, G. M. et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. **Blood**, v. 119, n. 26, p. 6335–6343, 2012.

THOMAS, P. G. et al. The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 566–575, 2009.

THOMSON, B. J. **Viruses and apoptosis** *International Journal of Experimental Pathology*, 2001.

TIONG-YIP, C. L. et al. Characterization of a respiratory syncytial virus L protein

inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3867–3873, 2014.

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

TUMPEY, T. M. et al. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14933–14944, 2005.

URBAN, C. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000639, 2009.

VENTRE, K.; RANDOLPH, A. G. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, p. CD000181, 2007.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. [s.l.: s.n.]. v. 53

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; CHOW, O. A.; NIZET, V. **Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps***Blood*, 2009.

VOROBEVA, N. V.; PINEGIN, B. V. Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 12, p. 1286–96, 2014.

WALSH, E. E.; FALSEY, A. R.; HENNESSEY, P. A. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 3, p. 791–795, 1999.

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

WANG, S. Z. et al. Neutrophils induce damage to respiratory epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. **European Respiratory Journal**, v. 12, n. 3, p. 612–618, 1998.

WANG, X.; LIM, H. J.; SON, A. Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. **Environmental health and toxicology**, v. 29, p. e2014007, 2014.

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

WARDINI, A. B. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 1, p. 259–64, 2010.

WARNATSCH, A. et al. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. **Science**, v. 349, n. 6245, p. 316–320, 2015.

WEISCHET, W. O. et al. Thermal denaturation of nucleosomal core particles. **Nucleic Acids Research**, v. 5, n. 1, p. 139–160, 1978.

WELLIVER, R. C. **Pharmacotherapy of respiratory syncytial virus infection** **Current Opinion in Pharmacology**, 2010.

WENDT, C. H.; HERTZ, M. I. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections in the immunocompromised host. **Seminars in respiratory infections**, v. 10, n. 4, p. 224–31, 1995.

WERTZ, G. W. et al. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. June, p. 4075–4079, 1985.

WHIMBEY, E. et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 376–379, 1995.

WONG, J. H. et al. Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. **Peptides**, v. 32, n. 6, p. 1117–1122, 2011.

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

WRIGHT, T. K. et al. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. **Respirology**, v. 21, n. 3, p. 467–475, 2016.

WU, H. et al. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 3, p. 652–665, 2007a.

WU, H. et al. **Immunoprophylaxis of RSV infection: Advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab** **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2008.

WU, S. J. et al. Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 10, p. 2719–2723, 2007b.

XU, J. et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis.

Nature Medicine, v. 15, n. 11, p. 1318–1321, 2009.

YIPP, B. G. et al. NETosis : how vital is it ? Review Article NETosis : how vital is it ? v. 122, n. 16, p. 2784–2794, 2014.

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

ZAMBON, M. C. et al. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: An observational study. **Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1410–1416, 2001.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. **Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications** *Acta Biochimica Polonica*, 2013.

ZHANG, B. et al. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis. Cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28443–28454, 2003.

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

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

ZIMMER, G.; BUDZ, L.; HERRLER, G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 31642–31650, 2001.

Anexo A

Versão preliminar do manuscrito seguindo as instruções da Revista *Frontiers in Immunology* (<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/sections/microbial-immunology#author-guidelines>)

PAPEL DAS NETs NO CURSO DA INFECÇÃO IN VITRO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV)

Larissa F. A. Diniz^{1,2*}, Bárbara K. Matsuba¹, Priscila S. S. de Souza^{1,2}, Lia V. Barbosa¹, Pedro M. R. de Souza¹, Gabriela C. Araujo², Letícia H. Kubo¹, Fátima P. Souza,³ Juliana Oliveira¹, Karina A. de Toledo^{1,2}

¹ Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Letras, Assis

² Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

³ Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

*Autor Correspondente: Larissa Figueiredo Alves Diniz, Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis/SP, Brasil. Tel: + 55-18-3302-5848;

E-mail: laridiniz9@gmail.com

RESUMO

Neutrófilos são recrutados para o tecido pulmonar de pacientes acometidos por diversas doenças respiratórias. No sítio de infecção, neutrófilos secretam NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), fibras de DNA decoradas com proteínas nucleares, granulares e citoplasmáticas. As NETs contribuem para a captura e inativação de diversos microorganismos. Estudos tem demonstrado que o acúmulo das NETs resulta em efeitos citotóxicos diretos sobre células endoteliais e epiteliais. O hRSV (*human Respiratory Syncytial Virus*), é a causa mais comum de doença grave do trato respiratório inferior em crianças pequenas em todo o mundo, gerando um alto custo para o sistema de saúde. Neutrófilos estimulados pela proteína F do hRSV geram NETs capazes de capturar partículas virais e assim reduzir a disseminação viral. A massiva produção de NETs causa obstrução das vias aéreas e contribui para o agravamento da doença. Portanto buscamos avaliar os efeitos benéficos e/ou deletérios das NETs no curso da infecção pelo hRSV. Células Hep-2 foram infectadas *in vitro* com diferentes inóculos de hRSV, antes ou depois de terem sido incubadas com as NETs. O contato das células com as NETs, antes da infecção viral (MOI 0.1), resultou em melhora da taxa metabólica e da viabilidade celular, acompanhadas de redução no número e dimensão dos sincícios formados. O aumento do inóculo viral (MOIs 0.5 e 1) reduziu tais efeitos benéficos. Células já infectadas e, que foram pós-tratadas com as NETs, apresentaram sincícios mais volumosos, que numericamente estavam reduzidos. O aumento na concentração das NETs ($\geq 8\mu\text{g/mL}$) agravou a mortalidade celular, o que refletiu numa redução do número e da dimensão dos sincícios formados. Análises *in silico*, foram favoráveis à geração de complexos proteína F/MPO e proteína F/Catapsina-G, envolvendo sítios de neutralização viral. Em resumo, nas fases precoces da infecção, onde a concentração das NETs e a carga viral estão reduzidas, há um predominante efeito benéfico das NETs, que contribui na captura do virion e na proteção de células não infectadas. A intensa geração das NETs em fases mais tardias da infecção, causa agravamento da morte celular. O detalhamento dos mecanismos envolvidos no equilibrado papel das NETs, na imunopatologia das doenças respiratórias, fornece subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que modulem a geração e a função das NETs no tecido pulmonar.

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

INTRODUÇÃO

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) contribui com a infecção respiratória causando bronquiolite, pneumonia e infecção pulmonar obstrutiva crônica em pessoas de todas as idades, mas afeta principalmente crianças e idosos, e juntamente com outras infecções virais lidera o *ranking* de alta mortalidade e morbidade [1]. Não existe tratamento específico para doenças causadas pelo hRSV, por conseguinte, medidas de alívio dos sintomas, de suporte ventilatório e de manutenção do estado geral são indicadas quando necessárias [2].

As células epiteliais são o alvo inicial da infecção pelo vírus hRSV. O hRSV induz a expressão de TLR3 e proteína quinase R nas células epiteliais levando ao aumento da responsividade das células epiteliais frente à infecção e levando a ativação da resposta imune inata [3]. Promove a ativação e o recrutamento de diferentes células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos, células T de memória e eosinófilos [4].

O hRSV aumenta a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) em células endoteliais durante a infecção *in vitro*, a adesividade celular aumentada resulta numa transmigração elevada de neutrófilos para o local [5;6]. Reconhece-se que o processo inflamatório nas vias aéreas de lactentes com bronquiolite por hRSV é dominado por um intenso influxo de neutrófilos tanto nas vias respiratórias inferiores quanto superiores [7;8] e que os produtos, tais como mieloperoxidase e elastase dos neutrófilos são liberados nas vias respiratórias [9].

Foi demonstrada a capacidade do vírus hRSV de induzir a liberação de NETs por neutrófilos humanos, sendo a proteína F do vírus a responsável por estimular esta liberação [10]. A proteína F, além de mediar a fusão do envelope viral à membrana citoplásmica, permitindo assim a infecção, é responsável pela fusão de células infectadas com células adjacentes, levando à formação de sincícios, células gigantes multinucleadas que é característica morfológica da presença do hRSV replicante num determinado tecido [11].

Diversos estudos propõem efeitos adversos nas respostas neutrofílicas na infecção por RSV [12;13;14]. Por exemplo, a depleção de neutrófilos resulta em menor inflamação das vias aéreas e expressão de mucinas em ratos infectados por RSV [13], sugerindo que os neutrófilos podem contribuir com a obstrução da via aérea durante a infecção. A oclusão da via aérea por um muco denso e células recobertas por muco é

característico durante a infecção por RSV e é de importância clínica relevante no desenvolvimento da falência respiratória e atelectasia [13].

Contudo, há muito ainda a ser estudado a respeito do papel das NETs frente a infecção viral, especialmente o hRSV. Portanto, no presente estudo, buscamos avaliar se as NETs apresentam um papel antiviral durante a infecção por hRSV.

MÉTODOS

Cultura Celular

Células Hep-2 (carcinoma de orofaringe), são provenientes do trato respiratório humano e permissivas à infecção e replicação do vírus hRSV [14;15] portanto estas células foram utilizadas para realizar nossos experimentos. Obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (Corning Glass Works, Nova York, NY, USA), incubadas em estufa umedecida à 37°C e 5% de CO₂ e meio de cultura DMEM F12 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil,) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

Estoque viral

O vírus hRSV cepa A2, cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Professor Livre-docente de Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP) foi amplificado em culturas de células Hep-2. Os estoques virais foram preparados em meio de cultivo DMEM F12 incompleto (não acrescido de SFB). Após a coleta do estoque viral, as alíquotas foram congeladas em DMEM F12 acrescido de trealose 10% e mantidas em freezer a -80°C até o momento do uso [14]. O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimm-Breschkin, 2004 e confirmado pelo ensaio de TCDI₅₀ [16].

Purificação e estimulação de neutrófilos humanos para geração das NETs.

Partindo do sangue periférico de voluntários declarados saudáveis, 10mL de sangue foram obtidos utilizando tubos de coleta de sangue contendo citrato de sódio Vacutainer de plástico (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). A amostra sanguínea, foi então colocada, cuidadosamente sobre 6mL de meio de separação Histopaque 1119 e 1077 (Sigma-Aldrich). As amostras foram centrifugadas a 700g, durante 30 minutos à 25° C,

aceleração 1 e frenagem 0. A parte referente aos neutrófilos foi coletada e lavada em PBS (mais ou menos duas vezes o volume de células), à 800g por 5 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI sem soro. A contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany), partindo da suspensão diluída 20 vezes em solução de Turk (20mL ácido acético glacial, 0.5g azul de metileno e água para 1L). E então, os neutrófilos foram estimulados. As NETs foram geradas seguindo modificações no procedimento descrito por Brinkmann et.al., 2010 com modificações [17;18]. Neutrófilos isolados e diluídos em RPMI sem soro foram adicionados em uma placa de 6 poços (1.8×10^6 /poço) com PMA na concentração de 25nM. A placa foi incubada por 3 horas, à 37°C em estufa umidificada e 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e as NETs foram lavadas dos poços, com meio RPMI sem soro, foram então coletadas, separadas em amostras e incubadas em banho-maria a 37°C ou a 40°C por 24 horas. Algumas amostras não sofreram incubação, foram apenas armazenadas, sendo consideradas NETs frescas. Às amostras de NET frescas foram adicionado 5µl de DNase para fragmentar (soltar) o DNA da amostra, foi deixado agir por 5 minutos, e então foi adicionado 5µl de EDTA para parar a ação da DNase, ambos reagentes da Thermo Scientific. Após a incubação, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação à 800g por 5 minutos e o sobrenadante armazenado em freezer -25°C. Para a quantificação do DNA foi utilizado o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Inc, Grand Island, NY, USA) através do kit PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen).

Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase

As amostras NET fresca, NET à 37°C e NET à 40°C, foram avaliadas quanto a sua atividade de mieloperoxidase. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 50 µl/poço de cada amostra de NETs (sendo feito triplicata para cada amostra) e como controle negativo foi utilizado meio RPMI sem soro. Então, em cada condição, foi adicionado substrato para mieloperoxidase (0.88mM), *3,3',5,5'-tetrametilbenzidina*. Foram deixadas incubadas por 1 hora em estufa umidificada à 37°C, 5% de CO₂. Após a incubação foi adicionado o *stopper*, e em seguida foi feita a leitura da absorbância em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), comprimento de onda de 405 nm. NETs fresca, que não passaram por período de incubação foram consideradas como 100% de atividade de mieloperoxidase. Os valores de absorbância foram equivalentes em cada amostra.

Avaliação da ação anti-hRSV das NETs.

Para avaliação da ação antiviral das NETs foram realizados ensaios de viabilidade celular através da adição do sal de MTT, contagem de sincícios sob microscopia de luz branca, coloração das células por azul de trypan e cálculo do tamanho dos sincícios. Nos ensaios realizados, células Hep-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^4 /poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10%, em estufa à 37°C umidificada 5% de CO₂. Neste trabalho foram realizadas duas abordagens metodológicas para avaliação da ação antiviral das NETs, foram realizados ensaios de pré e pós tratamento.

Ensaio de pré-tratamento

Com o objetivo de avaliar a ação da NET nas células antes da infecção viral, realizamos o teste de pré-tratamento. Às células previamente plaqueadas em placas de 96 poços, mantidas em cultura por 24h para um crescimento confluyente, foram adicionados diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL), somente aos poços correspondentes ao tratamento com NETs e foram deixadas incubando em estufa à 37°C umidificada com 5% de CO₂, por 2 horas. Em seguida, toda a suspensão com NETs é retirada e adiciona-se as suspensões virais (MOI 0.1, 0.5 e 1.0) e incuba-se por 2 horas novamente, em estufa à 37°C. Após retira-se toda a suspensão viral e adiciona-se 200µl de meio DMEM-F12 livre de SFB e mantêm-se a placa em incubação por 3-4 dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Como controle viral alguns poços receberam apenas as suspensões virais (MOI 0.1, 0.5 e 1.0), poços que não receberam nenhum tipo de tratamento, apenas meio de cultura, foram assumidos como controle celular. Houve a contabilização dos sincícios formados e foram feitas fotos dos poços. As células foram coradas com azul de trypan e a viabilidade celular foi determinada com o auxílio do ensaio colorimétrico com sal de MTT.

Ensaio de Pós-Tratamento

Células Hep-2 foram cultivadas em placa de 96 poços (5×10^4 células/poço) e mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F12 acrescido com SFB 10%, em estufa à 37°C umidificada 5% de CO₂, posteriormente, as células foram infectadas com soluções de hRSV (MOI 0.1, 0.5 e 1.0), em quadruplicata, e incubadas por 2 horas à 37°C. Em seguida, a suspensão viral é substituída por diferentes concentrações de NET (0,5-16µg/ml) em

um volume final de 100µl/poço. Então, a placa foi incubada por 3-4 dias em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. No segundo dia após a infecção, todos os poços da cultura foram acrescidos de 100µL de DMEM-F12 livre de SFB com o intuito de manter os nutrientes celulares e a validade dos antibióticos. Células que não receberam nenhum tratamento posterior, foram infectadas com o vírus como controle da infecção viral e células que não receberam nenhum tipo de tratamento foram assumidas como controle celular. Os sincícios foram contabilizados, foram tiradas fotos dos poços, as células foram coradas com azul de trypan e a viabilidade celular (em triplicata) foi determinada com o auxílio do ensaio colorimétrico com sal de MTT.

Ensaio com coloração por azul de trypan

Preparo da solução estoque de azul de trypan, 0,4%. Para isso, diluímos 120 mg do Trypan Blue em 30 mL de PBS 1x, obtendo uma solução de 4mg/mL (0,4%). Centrifugar antes do uso, durante 10 minutos, 2000 rpm. E então adiciona-se 50µl/poço, um poço por vez, deixa agir por 30 segundos, tira o sobrenadante e visualiza em microscopia de luz branca, tira fotos correspondentes a cada tratamento.

Ensaio colorimétrico de viabilidade por adição do sal de MTT

A adição do sal de MTT [1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan] em nossos testes foi feita seguindo as recomendações do fabricante (Sigma). Após os respectivos tratamentos em placas de 96 poços, o meio de cultura foi substituído por 100 µl de solução de MTT (0.5 mg/mL diluído em DMEM F12) e a placa foi levada à incubação por 2 horas, à 37°C em estufa umidificada e 5% de CO₂. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por 50µl de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma) para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan™ FC Microplate Photometer), com comprimento de onda de 560 nm. A metabolização do sal é diretamente proporcional à taxa metabólica, possibilitando assim inferir a viabilidade celular a partir da absorbância mensurada (Equação 1).

Equação (1)

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

Cálculo da área dos sincícios

Foi desenvolvido um algoritmo baseado em processamento de imagens e reconhecimento de padrões, que tem por objetivo fazer a mensuração da área dos sincícios. O algoritmo carrega a imagem da placa de 96 poços, retirada com uma câmera acoplada ao microscópio invertido (Nikon eclipse TS 100), para então aplicar uma série de filtros digitais que visam transformar e padronizar a imagem, para uma binária cujos objetos formados pelos pixels com valor um (cor branca) representam a área do sincício. E em seguida foi feita a conversão de pixels em milímetro quadrado.

Análise

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

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

Onde:

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

DO_{AT} é a densidade óptica obtida para cada uma das amostras-teste – DO_{CV} (densidade óptica do controle viral) e

DO_{CC100} é DO_{CC} – DO_{CV} (densidade óptica do controle celular – densidade óptica do controle viral).

Análise Estatística

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

Análises de Bioinformática

Screening por docking molecular.

Estruturas tridimensionais das proteínas F (PDB 4JHW), mieloperoxidase (PDB 1DNU) e catepsina G (PDB 1AU8) foram obtidas no Protein Data Bank (PDB). A proteína F é um componente essencial do vírus hRSV e indispensável para sua penetração na célula hospedeira. As proteínas mieloperoxidase e catepsina G compõem as NETs e estão relacionadas à ação microbicida das NETs. A estrutura tridimensional do anticorpo motavizumab (PDB 3IXT) também foi utilizada, como forma de comparação entre os complexos formados. A estrutura monomérica da proteína F, obtida pelo Protein Data Bank, foi utilizada para gerar a sua estrutura trimérica, utilizando o programa online Symmdock [19].

RESULTADOS

Geração das NETs

Para este estudo, as NETs foram geradas por neutrófilos estimulados com PMA (25nM) na ausência de soro fetal bovino (SFB) [20]. Os densos aglomerados de NETs foram dissolvidos em banho-maria (24h) à 37°C ou à 40°C, na ausência de DNase. A atividade enzimática nas amostras foi monitorada através da avaliação de atividade enzimática de mieloperoxidase (Figura 1A). Neste ensaio, a atividade de MPO presente nas amostras de NETs frescas, preparadas à 25°C (2h) na presença de DNase, foram consideradas como 100% de atividade. O aumento da temperatura (37 ou 40°C), do tempo de preparo e ausência de DNase resultou em queda de aproximadamente 50% da atividade de MPO (43,76% à 37°C e 45,36% à 40°C). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de NETs geradas à 37 ou 40°C. Para a continuidade do estudo, foram utilizadas NETs preparadas à 40°C, na ausência de DNase e que apresentaram fragmentos de elevado tamanho (> 10.000pb) (Figura 1B).

Curso da infecção por hRSV em células pré-tratadas com NETs

Nos ensaios de pré tratamento, células Hep-2 foram incubadas com diferentes concentrações de NETs (0.5 – 16 µg/mL) por 2h à 37°C antes de serem infectadas com diferentes MOIs de hRSV (0.1, 0.5 ou 1.0). No terceiro dia de cultivo, a células foram avaliadas quanto à sua morfologia, formação ou não de sincícios e viabilidade celular.

Os resultados correspondentes ao inóculo viral de MOI 0.1 demonstraram que o prévio contato das células, com baixas concentrações de NET (0.5-2 µg/mL), mantiveram a taxa metabólica em níveis muito próximos aqueles apresentados por células não tratadas (CV) (Figura 2A). O aumento da concentração das NETs (4-16 µg/mL) eleva a absorvância pelo sal de MTT, se equivalendo ao controle celular (CC). O ensaio de MTT pode ser usado como uma medida indireta da viabilidade celular. Estas observações foram complementadas e corroboradas com a análise de células coradas com azul de trypan (Figura 2D). Nota-se assim, uma melhora na viabilidade celular conforme as células foram previamente tratadas com crescentes concentrações de NET.

Destacamos que, as regiões celulares que apresentam maior concentração de azul de trypan correspondem às regiões de formação de sincícios (Figuras 2D). Paralelamente, foram quantificados o número e a área de extensão dos sincícios formados nas diferentes condições. Observa-se que há um decaimento no número e no tamanho dos sincícios em monocamadas de células que foram previamente tratadas com concentrações mais elevadas das NETs (8-16 µg/mL) (Figuras 2B e 2C).

Com o aumento do inóculo viral para MOI 0.5, algumas mudanças com relação ao MOI 0.1 foram observadas. A taxa metabólica das células se manteve baixa em todas as concentrações testadas de NETs (Figura 3A). A viabilidade celular observada pela coloração com azul de trypan indica morte celular semelhante em todas as células infectadas, tratadas ou não tratadas com NETs (Figura 3D). Foge deste padrão aquelas células tratadas com NETs 16 µg/mL, onde observamos um menor número de células coradas com azul de trypan com relação ao controle viral. Além disso, nestes poços observamos ainda redução no número e no tamanho dos sincícios, associada à um distanciamento entre as células da monocamada. Nas demais concentrações (0.5-4 µg/mL), embora haja uma redução na dimensão dos sincícios, o número deles se equivale ao controle viral (Figuras 3B e 3C).

O maior inóculo testado por nós, MOI 1.0, apresentou resultados muito semelhantes aqueles obtidos com MOI 0.5. Ou seja, o prévio contato das células com as NETs resulta em queda do número de sincícios (8-16 µg/mL) e queda na dimensão dos sincícios (0.5-16 µg/mL) (Figuras 4B e 4C), mantendo-se uma baixa taxa metabólica (Figura 4A) e viabilidade celular (Figura 4D).

Curso da infecção por hRSV em células pós-tratadas com NETs

Testes de pós tratamento foram realizados com inóculos virais nos MOIs 0.1, 0.5 e 1.0. Células Hep-2 foram incubadas com o vírus nos diferentes MOIs por 2h. Após a incubação, as monocamadas de células foram mantidas por 3 dias na presença de diferentes concentrações de NETs (0,5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No terceiro dia, as células foram analisadas microscopicamente quanto a sua morfologia, a formação ou não de sincícios, bem como foi feita a coloração com azul de trypan para a visualização da ocorrência ou não de morte celular. Mais uma vez, células infectadas foram usadas como controle viral (CV) e células não infectadas e não tratadas, como controle celular (CV).

Nossos testes com MOI 0.1 mostram uma tendência no aumento do metabolismo celular pós contato com concentrações crescentes de NETs (Figura 5A). Porém, em virtude da amplitude do desvio padrão experimental, as únicas concentrações estatisticamente diferentes foram 0.5 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A análise microscópica destas células, coradas ou não com azul de trypan, indica uma intensa presença de células mais alongadas, maior espaçamento entre as células e maior morte celular quando comparadas com o controle celular. Estes parâmetros se apresentaram comparáveis ao controle viral (Figura 5D e 5E). Com relação às características dos sincícios, concentrações menores de NETs (0.5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mantiveram o número de sincícios mas com tamanho aumentado, enquanto que concentrações maiores de NETs (8 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultaram em diminuição do número de sincícios mas com dimensão semelhante ao controle viral (Figura 5B e 5C).

Com o aumento do inóculo viral para o MOI 0.5, os resultados foram semelhantes, com pequenas alterações. Os dados do metabolismo celular foram mais homogêneos, mostrando novamente uma tendência de aumento nos valores deste parâmetro após tratamento das células com as NETs, porém, apenas a concentração de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrou-se estatisticamente significativa (Figura 6A). A intensa coloração com azul de trypan (Figura 6E) corrobora os dados do sal de MTT mostrando haver morte celular equivalente entre células tratadas com NETs e células do controle viral. A análise morfológica indica a presença de células mais alongadas e escassas nos poços que foram cultivados com as NETs. Nota-se ainda, uma redução no número de células quando as estas foram tratadas com concentrações mais elevadas de NETs (8 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 6D). Com relação ao número de sincícios, todas as condições testadas resultaram numa diminuição numérica deles (Figura 6B). Por outro lado, apenas concentrações mais elevadas (4-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) indicaram redução na dimensão de tais estruturas (Figura 6C).

Ao elevarmos o MOI testado para 1.0, a taxa metabólica das células se manteve semelhante aquele apresentado pelo controle viral independente da concentração de NET

utilizada (Figura 7A). A análise morfológica das células indica que, quando o tratamento foi feito com concentrações menores de NETs (0.5-4 µg/mL), a dimensão dos sincícios foi elevada, sendo maiores do que o controle viral (Figura 7C e 7D). Tais observações foram confirmadas através do dimensionamento quantitativo dos sincícios (Figura 7B). Observamos ainda, que nas maiores concentrações de NETs (8-16 µg/mL) houve uma redução no número de células aderentes nos poços e na dimensão dos poucos sincícios ali encontrados (Figura 7D). A contagem do número de sincícios mostra uma queda significativa em todas as concentrações de NET testadas em comparação ao controle viral (Figura 7B). Além de ser observado uma queda na viabilidade (Figura 7E).

Análises de docking molecular

Para a realização do *docking molecular*, foi utilizado o banco de dados Protein Data Bank para buscar as estruturas de cristalografia referentes à proteína F do hRSV e de ambas as proteínas das NETs (MPO e Cat G). A estrutura do anticorpo Motavizumab (PDB 3IXT), foi buscada por já ter sua interação com a proteína F descrita e será utilizada em comparação com os outros complexos gerados. Ele interage com o sítio A (sítio II) da proteína F que neutraliza a fusão do vírus com a célula [21].

A estrutura da proteína F na conformação de pré-fusão, obtida pelo PDB encontra-se na forma monomérica (4JHW). O trímero foi gerado utilizando-se o servidor Symmdock. Dentre as 100 estruturas geradas, escolhemos o modelo que apresentou maior *score*, 13186 (pontuação utilizada para indicar os melhores complexos gerados) e maior área de contato entre os domínios de oligomerização. Esta mesma estrutura foi usada para a realização dos *dockings moleculares* deste estudo. A descrição do trímero foi compatível com aquela observada na literatura [22]. As estruturas escolhidas para a mieloperoxidase (PDB 1DNU) e catepsina G (PDB 1AU8) seguiram os mesmos critérios.

As análises de *docking molecular* entre a proteína F e o anticorpo motavizumab (PDB 3IXT) (Figura 8A) foram realizadas pelo servidor Patchdock, com refinamento de dados pelo Firedock. A interação da proteína F com o anticorpo motavizumab, ocorreu no sítio A da proteína F (Figura 8A) com energia de -14,62 kcal/mol, alto *score* (13076) e uma área extensa de superfície de contato entre as duas proteínas de 1772,20 Å.

Os melhores modelos dos complexos gerados entre proteína F e mieloperoxidase, via Patchdock e refinados pelo Firedock, apresentaram energia de -27,84 kcal/mol, alto *score* de 12630 e uma alta área de superfície de contato de 1671,40 Å (Figura 8B). A

baixa energia qualifica o complexo como possível e estável já que, quanto menor a energia de ligação de um complexo, mais estável é sua interação. Além disso, os dados foram semelhantes aqueles obtidos para o anticorpo Motavizumab.

Os servidores apontaram dois prováveis sítios de interação para MPO e proteína F. O primeiro localiza-se próximo do sítio I, o qual interage com alguns anticorpos, porém com pouca ou sem atividade de neutralização [23]. O segundo trata-se do sítio de glicosilação. Dos sítios de glicosilação, o n500 é o mais importante quando se diz respeito a atividade de fusão [24], quando essa região é mutada há uma drástica redução na formação de sincícios [25].

O *docking molecular* entre a catepsina G e a proteína F também apresentou bom valor de energia (-26,95 kcal/mol) para o melhor modelo do *rank, score* de 13302, e uma área de interação de 1875.30 Å, sendo possível que haja interação entre essas proteínas. A interação se deu próxima do sítio C, conhecido na literatura por se ligar aos anticorpos MAb19 [26] e 101F [27], ambos neutralizantes de hRSV, e do sítio A (II), mesmo sítio de interação para o Motavizumab (Figura 8C).

As análises *docking molecular* foram ainda repetidas para a proteína F na sua conformação de pós-fusão. O modelo escolhido da proteína pós fusão (PDB 3RRR), seguiu os mesmos moldes da escolha das outras proteínas.

O *docking molecular* foi realizado pelo servidor Patchdock e posteriormente refinado pelo Firedock. Da interação entre proteína F pós-fusão e motavizumab, a ligação se deu no sítio II como descrito na literatura [28], com baixa energia de ligação -21,09 kcal/mol, alto score (11144) e alta área de interação 1384.90 Å (Figura 9A).

Da interação entre proteína F-pós fusão e MPO (Figura 9B), as conformações obtidas apresentaram baixa energia de ligação (-13,06 kcal/mol), score 12046 e área de interação 2215.60 Å, e a interação se deu próxima à região do sítio A e C.

A interação proteína F-pós e catepsina G (Figura 9C), também apresentou bom valor de energia -26,76 kcal/mol, valor de score 13070 e área de interação 1720.60 Å, sendo bons indicativos da possibilidade de ocorrência da interação. Além disso, a interação se deu próxima do sítio antigênico IV e I (Figura 9C).

DISCUSSÃO

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos do trato respiratório em pacientes infectados por hRSV é bem descrito [29;8]. O contato dos neutrófilos com o hRSV resulta em diversas atividades inflamatórias, inclusive a liberação das NETs via estímulo de receptores TLR [10]. Embora as NETs tenham ação microbicida, a presença delas no tecido também tem sido associada com efeitos deletérios durante o progresso de diversas infecções [30;31;32]. Neste estudo, nós demonstramos que o prévio contato das células com as NETs retarda a evolução da infecção *in vitro* pelo hRSV, em células Hep-2, de maneira dose- e carga viral-dependentes. Por outro lado, a presença das NETs apresenta um efeito deletério sobre células já infectadas.

Sampaio et al demonstraram que as NETs possuem ação virucida contra hRSV (*dados não publicados*). As NETs, que apresentaram uma $CC_{50} > 67 \mu M$, foram eficientes em reduzir o dano celular induzido por hRSV em células Hep-2. Os MOIs testados foram 0.1, 0.5 e 1.0, onde apenas o último não foi inibido em ao menos 50% pela ação virucida das NETs. Sampaio et al demonstraram ainda que esta ação virucida poderia ser resultado de uma interação entre algumas proteínas das NETs (elastase e histonas) com a proteína F do vírus.

Num tecido pulmonar, acometido por hRSV, o recrutamento leucocitário ocorrerá posteriormente à chegada do patógeno ao tecido. Os neutrófilos que são a primeira linha de defesa do organismo, atraídos pelos mediadores inflamatórios secretados por células infectadas e por outros leucócitos residentes, encontrarão um cenário de células infectadas e não infectadas e ainda de partículas virais extracelulares. Assim, tivemos por objetivo aqui investigarmos o papel das NETs sobre o curso da infecção do hRSV tanto em células infectadas e não infectadas. Para tanto, nos utilizamos de protocolos que foram denominados de pré- e pós-tratamento.

O processo de liberação das NETs, denominado NETose, foi inicialmente examinado em resposta ao estímulo do mitógeno PMA, um potente indutor de NETs. Infecções microbianas iniciam o processo de NETose e, semelhante ao PMA, elas ativam proteína quinase C (PKC), a qual induz influxo de cálcio intracelularmente e ativação da cascata de sinalização via NADPH oxidase. O resultado final é a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) [33;34]. A proteína F do hRSV, à exemplo do PMA, induz liberação de NETs compostas por DNA, histonas, elastase e mieloperoxidase, de maneira ROS dependente [10]. As NETs geradas neste estudo foram estimuladas por PMA na ausência de SFB, uma vez que este contém DNAses que poderiam degradar nossas redes

[25]. Além disso, as NETs foram submetidas à incubação de 24h à 40°C para que o denso envelado de DNA fosse dissolvido. Nossos resultados demonstraram que nestas condições, mantivemos uma solução homogênea de longos fragmentos de DNA e que ainda continha, aproximadamente 50% da atividade enzimática de mieloperoxidase. Estudos demonstraram uma forte estabilidade de MPO frente a altas temperaturas num curto espaço de tempo. Em incubação da MPO à 75°C por 5 minutos, esta sofreu uma inativação de apenas 10% [35]. Outro estudo mostrou que a incubação de MPO à 80°C por 15 minutos manteve em 50% a sua atividade residual [36]. Ao analisarmos outras macromoléculas das NETs, verificamos que as histonas começam a apresentar mudanças na sua estrutura a partir de aproximadamente 65 °C [37], enquanto o DNA possui uma temperatura de melting (T_m), temperatura à qual metade da sequência de bases está desnaturada, de 76,2 °C, começando a sofrer desnaturação por volta de 70 °C [38]. A queda de atividade entre NETs incubadas à 25°C e 37-40°C poderia ser reflexo do uso DNase no primeiro caso. A DNase, ao relaxar as fibras de DNA através de sua clivagem, poderia aumentar a disponibilidade de MPO em solução e conseqüentemente melhorar sua resposta enzimática. A atividade enzimática de MPO entre NETs incubadas à 37°C ou à 40°C não apresentou diferença estatística significativa. Este resultado teve uma grande relevância biológica tendo por base a temperatura fisiológica humana de 37°C, aproximando assim nossos resultados das condições existentes *in vivo*.

Neutrófilos exercem um importante papel na imunopatologia durante infecções por hRSV e são continuamente recrutados da medula óssea e fluxo sanguíneo para os pulmões. Cortjens et al (2016) [39] demonstraram que, a despeito da captura de partículas virais pelas NETs, a formação exagerada das NETs nas vias aéreas contribui para a obstrução pulmonar e agravamento clínico do paciente [39]. Em busca dos mecanismos que possam esclarecer esse papel deletério das NETs durante a infecção por hRSV, lançamos mão de uma estratégia combinada de ensaios *in vitro* e *in silico*. Células Hep-2, infectadas com hRSV e tratadas pre- ou posteriormente com diferentes concentrações de NETs, foram monitoradas quanto à taxa metabólica, viabilidade celular, número e extensão de sincícios formados na monocamada.

Células Hep-2, pré-tratadas com diferentes concentrações das NETs, foram infectadas com diferentes inóculos virais (MOIs 0.1, 0.5 e 1.0). Após três dias de cultura, observamos um efeito dose- e inóculo-dependente das NETs sobre a monocamada celular. No menor inóculo testado (MOI 0.1), o pré-tratamento com as NETs (4-16 µg/mL) resultou numa melhora da taxa metabólica e da viabilidade celular,

acompanhadas de redução no número e dimensão dos sincícios formados. O efeito benéfico das NETs foi reduzido à medida que o inóculo viral foi aumentado (MOIs 0.5 e 1.0). Nestas condições, observamos queda do número (NETs 8-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e na dimensão dos sincícios (NETs 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No entanto, a taxa metabólica e a viabilidade celular se mantiveram baixas, em níveis comparáveis aqueles apresentados por células que haviam sido infectadas na ausência de qualquer tratamento prévio.

O contato das NETs com células Hep-2 já infectadas resultou em efeitos semelhantes ao pré-tratamento no que diz respeito ao comportamento dose- e inóculo dependentes. Porém, alguns parâmetros foram agravados. A taxa metabólica que apresentava uma tendência de alta frente a um MOI menor (0.1), se manteve próxima dos mesmos níveis proporcionados por controles virais de MOIs mais elevados (0.5 e 1.0). O pós-tratamento das células com concentrações menores de NETs (0.5-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultou numa redução no número de sincícios, porém a dimensão destes estava aumentada. Concentrações maiores de NETs (8-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) também reduziram o número de sincícios, mas sempre acompanhada de redução no número de células aderentes nos poços de tratamento. Em resumo, o pós-tratamento trouxe agravamentos no curso da infecção comparado aos efeitos observados no pré-tratamento.

A denominação “Vírus Sincicial Respiratório”, deriva de sua característica de gerar sincícios resultantes da fusão de células infectadas, formando uma célula multinucleada [40]. Estudos indicam que o sincício promove um eficiente e rápido mecanismo de disseminação viral célula-célula [41;42]. Embora, múltiplas proteínas virais podem ser necessárias para uma indução ótima na formação do sincício, a proteína F é o mediador central deste processo [43]. O tratamento com as NETs, claramente interfere na formação dos sincícios pelas células infectadas pelo hRSV. Células pré-tratadas com NETs tendem a apresentar uma redução no número e na dimensão dos sincícios formados, enquanto que o posterior contato destas células com as NETs, levam a um aumento no tamanho dos sincícios que agora se apresentam em número menor. Tais efeitos podem ser resultado de uma (a) modulação na expressão de proteína F na superfície das células infectadas, (b) alteração na conformação da proteína F expressa ou mesmo (c) ação direta das NETs sobre a proteína F que está na membrana plasmática das células infectadas.

As NETs são compostas por uma grande quantidade e variedade de enzimas que degradam citocinas e quimiocinas via serino proteases [44]. A proteína F poderia ser um alvo para estas diversas enzimas, dentre elas, elastase, mieloperoxidase, catepsina G,

metaloproteinases, proteinase-3, lisozima, colagenase, catalase [45]. Resultados *in silico*, indicam uma possível interação entre as enzimas elastase (Sampaio et al, *dados não publicados*), mieloperoxidase e catepsina-G com a proteína F viral. No entanto, em nenhuma das análises foi detectada interação destas macromoléculas via sítio enzimático que pudesse gerar qualquer tipo de clivagem da proteína F por estas enzimas. Além disso, os ensaios de pré- e pós-tratamento, apresentaram resultados opostos com relação à dimensão dos sincícios formados, mesmo que, em ambos os protocolos, as NETs estivessem distribuídas extracelularmente e assim, livres para eventuais contatos. Estes dados afastam a possibilidade de que a queda ou o aumento no número de sincícios, observados, respectivamente, em células pré-tratadas e pós-tratadas com as NETs, reflita um efeito direto e enzimático sobre a proteína F do hRSV.

Embora a característica das NETs seja a capacidade de neutralizar e matar agentes patogênicos, muitos estudos tem descrito um papel modulatório das NETs sobre a expressão de determinadas macromoléculas [46;47;48;49;50;51]. Células dendríticas ativadas por NETs apresentam aumentada produção de interferão de tipo I [46;48;49]. NETs ativam macrófagos a produzir IL-6, factor de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 β e interleucina-10 (IL-10) [52;53]. Por outro lado, os NETs inibem a ativação de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) pelo lipopolisacarídeo (LPS) e promovem a polarização para uma resposta imune Th2 [54]. Recentemente, foi demonstrado que NETs previnem a diferenciação de DC derivadas de monócitos tratados com IL4-GM-CSF por exercer uma regulação transcripcional do receptor de IL-4 e por digerir aqueles que por ventura foram expressos [55]. Estes dados suportam a hipótese de que, a presença das NETs possa interferir de alguma forma com a transcrição, tradução, secreção e/ou expressão da proteína F à partir de células infectadas por hRSV, e assim, afetar o número e a dimensão dos sincícios gerados durante o curso da infecção. Nós não determinamos se as NETs possuem algum efeito direto ou indireto sobre a proteína F. Estudos futuros devem direcionar esta questão que resta em aberto.

A infecção *in vitro* de células pelo hRSV, geralmente resulta em apoptose, considerada não-lítica, o que facilitaria a disseminação das partículas virais [56]. A formação de sincícios é o principal fator de morte em culturas celulares não-polarizadas, mas *in vivo*, sua formação não é um importante indicativo histopatológico [40]. Particularmente, em células Hep-2, a infecção por hRSV ativa vias antiapoptóticas nestas, retardando assim a morte celular [57]. Neste estudo, a morte celular de células Hep-2 durante o curso da infecção por hRSV foi monitorada através do ensaio de MTT e da

coloração por azul de trypan. Respectivamente, estes ensaios possibilitam avaliarmos a taxa metametabólica mitocondrial e células em apoptose tardia ou em necrose. A análise combinada destes dois métodos nos permitiu verificar que o prévio contato das células com as NETs reduz a morte celular de células Hep-2 infectadas pelo vírus hRSV. Este efeito protetor se mostrou mais evidente quando o menor inóculo viral foi testado na presença das maiores concentrações de NETs aqui estudadas ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$). Nós hipotetizamos duas razões para a obtenção de tais resultados. No primeiro cenário, o número de partículas virais disponíveis para infecção viral estaria reduzido em virtude da ação virucida das NETs localizadas sobre a monocamada celular. Num segundo cenário, o contato das NETs com as células, antes da infecção viral, poderia ativar vias antiapoptóticas e/ou reduzir o ciclo viral replicativo e por conseguinte os efeitos nocivos à cultura celular. A ativação das vias antiapoptóticas foi descartada por nós uma vez que outros estudos demonstram o efeito citotóxico das NETs em mais de 50% de células endoteliais e epiteliais [18]. Dentre os componentes das NETs, a adição de LL-37 demonstrou efeito antiviral contra HIV por inibir a atividade intracelular de proteases e da transcriptase reversa [58;59]. Em estudos envolvendo RSV, LL-37 é internalizada e retida por células Hep-2 as quais adquire um estado antiviral e reduzida replicação do vírus [60]. Em conjunto, estes dados reforçam a ideia de que o efeito virucida das NETs associado a uma possível interferência nas etapas intracelulares do ciclo replicativo do hRSV, seriam, ao menos parcialmente, responsáveis pela proteção induzida pelas NETs sobre células não infectadas.

Kotelkin et al [57], demonstraram que a infecção pelo vírus hRSV sensibiliza as células à morte por apoptose através da modulação na expressão de fatores pró-apoptóticos da família Bcl-2 e caspases, bem como fatores anti-apoptóticos, especialmente Mcl-1 [57]. Embora os autores tenham tido dificuldade em reproduzir tais efeitos nas células Hep-2, células A549 se mostraram um bom modelo para tais estudos. Nós apresentamos aqui que, o posterior contato de células já infectadas com NETs ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$) resulta em intensa morte celular, evidenciada pela redução no número de células aderentes no poço. Apesar das análises microscópicas, por vezes, os dados de MTT se mostraram contraditórios, principalmente nas concentrações de NET 16 $\mu\text{g/mL}$ onde, visivelmente havia aumento na leitura de MTT concomitante a uma intensa redução no número de células. O MTT é um sal metabolizado pelas mitocôndrias de células vivas que geram cristais de formazan [61]. Embora, o uso do MTT como uma medida indireta da viabilidade celular seja bem aceito, diversos estudos tem chamado à atenção sobre a

interpretação dos seus resultados [62;63;64]. Estes estudos demonstram que a metabolização do sal de MTT pode ser aumentada em células que se encontram numa fase pré-apoptótica, onde houve inibição do ciclo celular. Nestas condições, as células apresentam aumento do volume celular, do número e da atividade mitocondrial. Assim, a combinação de mais de um método para avaliarmos o impacto das NETs sobre o curso da infecção *in vitro* pelo hRSV, nos permite dizer que o pré-tratamento das células tem um efeito benéfico dose- e carga viral dependentes, enquanto que o posterior contato com as NETs é deletério para células já infectadas.

A captura de partículas virais pelas NETs mostrou reduzir a infectividade em culturas de células *in vitro*, sugerindo que as NETs podem contribuir para limitar a disseminação de diversas doenças virais [65;39;66;67;68]. A ligação viral às NETs provavelmente é influenciada pela carga elétrica positiva das histonas, uma das principais proteínas (70%) presentes nas NETs [69], causando atração de vírion carregados negativamente. O vírus sincicial respiratório (RSV), um agente patogênico típico em lactentes e crianças pequenas, induz a NETosis [10] dependente de TLR-4 e o aprisionamento de RSV nas fibras das NETs resulta em menor infecção viral de células cultivadas *in vitro* [39].

Ferramentas de bioinformática devem ser usadas como complementaridade aos testes experimentais [70]. Neste trabalho, a bioinformática foi utilizada para complementar os resultados obtidos e enriquecer o estudo. A interação de duas proteínas das NETs, mieloperoxidase e catepsina-G, com a proteína de fusão do hRSV, foi investigada. Para tanto, foram realizadas análises de *docking molecular* via servidor Patchdock que avalia possíveis atracamentos de macromoléculas considerando-se sua complementaridade estrutural. Por ser um servidor que realiza interações proteína-proteína ou proteína-ligante como corpo rígido [71], foi necessário um refinamento dos dados no servidor Firedock, de modo que a flexibilidade das macromoléculas fosse incluída na análise [72;73].

A proteína F do hRSV é responsável pela fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira, e é um estágio crucial no ciclo de vida de todo vírus envelopado, pois é necessária para facilitar a deposição do genoma viral intracelularmente para que este se replique [74]. Promove ainda, a fusão da membrana de células infectadas com as células adjacentes, formando os sincícios [75], além de estimular a liberação das NETs [10]. A resposta neutralizante dos anticorpos em relação ao hRSV é predominantemente

direcionada à proteína F em sua forma de pré- fusão. No entanto, a partícula infecciosa de hRSV possui também em sua superfície proteína F em sua forma de pós-fusão [76;77]. A proteína mieloperoxidase (MPO) é o principal componente encontrado nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos [78;79;80]. Ela é uma heme-enzima, pró-inflamatória, compreendendo 5% das proteínas totais dos neutrófilos e 25% das proteínas granulares [79]. MPO está envolvida no processo de formação das NETs [81] e tem propriedades antivirais [82;68]. Catepsina G tem função antimicrobiana [83] e é capaz de clivar fatores de virulência de patógenos [84].

Apesar das estruturas da proteína F pré e pós fusão terem conformações diferentes, elas compartilham aproximadamente 50% de suas áreas de superfície, incluindo dois sítios antigênicos bem definidos (II e IV), que tem neutralização moderada. Presentes unicamente na superfície pré-F, há relatado na literatura, ao menos de três sítios antigênicos (Ø, III e V) que são de alta neutralização, principalmente o sitio Ø. Anticorpos que se ligam ao sitio antigênico I tem fraca ou nenhuma atividade de neutralização e ligam-se quase que exclusivamente à proteína F-pós fusão [23]. Nossos resultados apresentaram boas energias de ligação em sítios importantes, tanto na proteína F pré como na pós fusão, sugerindo que há possibilidade de interação entre ambas formas da proteína F com a mieloperoxidase e a catepsina G. Além de terem apresentado uma ampla superfície de contato e estarem próximas de aminoácidos correspondentes a sítios importantes da proteína F. A interação das proteínas das NETs com a proteína F poderia implicar em uma ação antiviral dessas proteínas, ao bloquear etapas importantes da infecção viral, como adesão e fusão dos virions às células.

Apesar do potencial papel anti-patogênico das NETs na imunidade inata do hospedeiro acometido por uma doença viral, esta proteção pode ser facilmente sobreposta por dano generalizado. Durante as doenças respiratórias, a injúria e a obstrução pulmonar seriam os dois principais fatores responsáveis por tais danos. Saffarzadeh et al. mostraram que a formação das NETs induz morte de células epiteliais e endoteliais *in vitro* [18], sugerindo um efeito citotóxico direto das NETs mediado pelas histonas e mieloperoxidase, mas não por elastase. Uma severa obstrução aérea causada por muco rico em DNA é uma importante característica da bronquiolite aguda em crianças infectadas por RSV. NETs foram detectadas no lavado broncoalveolar destes pacientes [39]. Neste mesmo trabalho, análises histopatológicas das vias aéreas de bezerros com severa infecção por RSV mostraram uma obstrução generalizada por meio de muco rico em mucinas, restos celulares e NETs [39].

Vários modelos experimentais tem descrito um efeito benéfico na diminuição da permeabilidade pulmonar, melhora nas trocas gasosas e mesmo mortalidade do hospedeiro ao utilizar estratégias que inibam ou degradem as NETs. Nestes trabalhos, foram testados anticorpos bloqueadores de histonas ou inalação de DNase [84;85;86]. Especificamente para casos de hRSV, a inalação de DNase em crianças com quadros de bronquiolite reduz o colapso pulmonar, mas a terapia não apresentou comprovação de benefícios clínicos quando comparada a pacientes com bronquiolite leve [87;88]. Embora o tratamento com Dnase possa reduzir os efeitos adversos de NETs, é importante perceber que a degradação delas também pode ter consequências indesejadas nos pulmões. *In vitro*, a digestão de NETs por nucleases, como DNase ou MNase (nuclease microcócica), não reduz sua citotoxicidade [18], sugerindo que a ação prejudicial das proteínas das NETs independa delas estarem presas ou não às fibras de DNA. A liberação destas proteínas no meio extracelular pode ainda resultar em danos teciduais mais distantes, o que traria consequências sistêmicas. Da mesma forma, a digestão as NETs também contribuiria para a disseminação de agentes patogênicos nela capturados [89].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAWAGE, S. S. et al. Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. **Adv Virol**, v. 2013, p. 595768, 2013.
2. YU, K. L. et al. Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity in vivo. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 5, p. 1115–1122, 2006.
3. GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 277–319, 2017.
4. GROSKREUTZ, D. J. et al. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 3, p. 1733–40, 2006.
5. ARNOLD, R.; KONIG, W. Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively intercellular adhesion molecule-1 expression. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7359–7367, 2005.
6. RZEPKA, J. P.; HAICK, A. K.; MIURA, T. A. Virus-infected alveolar epithelial cells direct neutrophil chemotaxis and inhibit their apoptosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 833–841, 2012.

7. EVERARD, M. L. et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. **Archives of disease in childhood**, v. 71, n. 5, p. 428–32, 1994.
8. SMITH, P. K. et al. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 37, n. 2, p. 146–151, 2001.
9. ABU-HARB, M. et al. IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. **European Respiratory Journal**, v. 14, n. 1, p. 139–143, 1999.
10. FUNCHAL, G. A. et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.
11. COLLINS, P.L.; CHANOCK, R.M.; AMURPHY, B.R. Respiratory syncytial virus. In *Fields virology*. 4th edition, 2001, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1443–1486.
12. STOKES, C. A. et al. Role of interleukin-1 and MyD88-dependent signaling in rhinovirus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 15, p. 7912–21, 2011.
13. STOKES, K. L. et al. The respiratory syncytial virus fusion protein and neutrophils mediate the airway mucin response to pathogenic respiratory syncytial virus infection. **J Virol**, v. 87, n. 18, p. 10070–82, 2013.
14. STOPPELENBURG, A. J. et al. Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 5, p. 1274–1279, 2014.
15. GUPTA, C. K. et al. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. **Vaccine**, v. 14, n. 15, p. 1417–1420, 1996
16. SRINIVASAKUMAR, N.; OGRA, P. L.; FLANAGAN, T. D. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. **Journal of virology**, v. 65, n. 8, p. 4063–4069, 1991.
17. RASMUSSEN, L. et al. A high-throughput screening strategy to overcome virus instability. **Assay and drug development technologies**, v. 9, n. 2, p. 184–190, 2011.
18. NAJMEH, S. et al. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. **Journal of Visualized Experiments**, n. 98, p. 353025, 2015.
19. SAFFARZADEH, M. et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
20. DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. **Algorithms in Bioinformatics**, p. 185–200, 2002.

21. VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; CHOW, O. A.; NIZET, V. **Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps***Blood*, 2009.
22. MCLELLAN, J.S.; CHEN, M.; KIM, A. et al. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. *Nature structural & molecular biology*, 2010, 17(2):248-250.
23. MCLELLAN, J. S.; RAY, W. C.; PEEPLES, M. E. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 83–104, 2013.
24. KILLIKELLY, A. M.; KANEKIYO, M.; GRAHAM, B. S. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 34108, 2016
25. ZIMMER, G.; BUDZ, L.; HERRLER, G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 31642–31650, 2001.
26. ARBIZA, J. et al. Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 9, p. 2225–2234, 1992.
27. WU, S. J. et al. Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 10, p. 2719–2723, 2007
28. MCLELLAN, J. S. et al. Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. **Journal of Virology**, v. 85, n. 15, p. 7788–7796, 2011.
29. EVERARD, M. L. et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. **Archives of disease in childhood**, v. 71, n. 5, p. 428–32, 1994.
30. MASSBERG, S. et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. **Nature Medicine**, v. 16, n. 8, p. 887–896, 2010.
31. NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, 2011.
32. PAPAYANNOPOULOS, V.; STAAB, D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving dnase therapy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.
33. HAKKIM, A. et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2011.

34. KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 2012.
35. OLSEN, R. L.; LITTLE, C. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. **The Biochemical journal**, v. 209, n. 3, p. 781–7, 1983.
36. BANERJEE, S. et al. Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 2, p. 375–387, 2011.
37. WEISCHET, W. O. et al. Thermal denaturation of nucleosomal core particles. **Nucleic Acids Research**, v. 5, n. 1, p. 139–160, 1978.
38. WANG, X.; LIM, H. J.; SON, A. Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. **Environmental health and toxicology**, v. 29, p. e2014007, 2014.
39. CORTJENS, B. et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. **The Journal of pathology**, v. 238, n. 3, p. 401–11, 2016
40. COLLINS, P. L.; FEARN, R.; GRAHAM, B. S. Respiratory syncytial virus: Virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 3–38, 2013.
41. ELLIS DUTCH, R.; JARDETZKY, T. S.; LAMB, R. A. **Virus membrane fusion proteins: Biological machines that undergo a metamorphosis** **Bioscience Reports**, 2000.
42. PASTEY, M. K. et al. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 35–40, 2000.
43. TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M. E. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. **Journal of virology**, v. 75, n. 15, p. 6825–34, 2001.
44. SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 511–517, 2014.
45. DĄBROWSKA, D. et al. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. **Scandinavian journal of immunology**, 2016.

46. GARCIA-ROMO, G. S. et al. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, p. 73ra20-73ra20, 2011.
47. KESSENBROCK, K. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. **Nature Medicine**, v. 15, n. 6, p. 623–625, 2009.
48. LANDE, R. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 564–569, 2007.
49. LANDE, R. et al. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, p. 73ra19-73ra19, 2011.
50. LEFFLER, J. et al. Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3522–3531, 2012.
51. SANGALETTI, S. et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3007–3018, 2012.
52. BRAIAN, C.; HOGEA, V.; STENDAHL, O. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, n. 6, p. 591–602, 2013.
53. WARNATSCH, A. et al. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. **Science**, v. 349, n. 6245, p. 316–320, 2015.
54. BARRIENTOS, L. et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 11, p. 5689–5698, 2014.
55. GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Neutrophil extracellular traps reprogram IL-4/GM-CSF-induced monocyte differentiation to anti-inflammatory macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, 2017.
56. THOMSON, B. J. **Viruses and apoptosis** **International Journal of Experimental Pathology**, 2001.
57. KOTELKIN, A. et al. Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Journal of virology**, v. 77, n. 17, p. 9156–72, 2003.
58. BERGMAN, P. et al. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. **Current HIV Research**, v. 5, n. 4, p. 410–415, 2007.
59. WONG, J. H. et al. Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. **Peptides**, v. 32, n. 6, p. 1117–1122, 2011.

60. LAU, Y. E. et al. Interaction and Cellular Localization of the Human Host Defense Peptide LL-37 with Interaction and Cellular Localization of the Human Host Defense Peptide LL-37 with Lung Epithelial Cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 583–591, 2005.
61. SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRÄULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 77, p. 383–393, 1963.
62. BERNHARD, D. et al. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 195, n. 2, p. 193–199, 2003.
63. JABBAR, S. A; TWENTYMAN, P. R.; WATSON, J. V. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. **British journal of cancer**, v. 60, n. 4, p. 523–528, 1989.
64. PAGLIACCI, M. C. et al. Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. **European Journal of Cancer**, v. 29, n. 11, p. 1573–1577, 1993.
65. BRADLEY, L. M. et al. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.
66. GALANI, I. E.; ANDREAKOS, E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 4, p. 557–564, 2015.
67. LINDEMANS, C. A et al. Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 176, n. 9, p. 5529–5537, 2006.
68. SAITOH, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012.
69. JENNE, C. N.; KUBES, P. Virus-induced NETs--critical component of host defense or pathogenic mediator? **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004546, 2015.
70. VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. [s.l: s.n.]. v. 53.
71. SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Predicting molecular interactions in silico: II. Protein-protein and protein-drug docking. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 1, p. 91–107, 2004.

72. ANDRUSIER, N.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 69, n. 1, p. 139–159, 2007.
73. MASHIACH, E. et al. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W229-32, 2008.
74. LAMB, R. A. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 1–11, 1993.
75. WERTZ, G. W. et al. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. June, p. 4075–4079, 1985.
76. LILJEROOS, L. et al. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11133–11138, 2013.
77. MCLELLAN, J. S. Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. **Current Opinion in Virology**, v. 11, p. 70–75, 2015.
78. SCHULTZ, J.; KAMINKER, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 96, n. 3, p. 465–467, 1962.
79. SEGAL, A. W. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 197–223, 2005.
80. SEO, S. U. et al. Type I interferon signaling regulates Ly6Chi monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.
81. VOROBEVA, N. V.; PINEGIN, B. V. Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 12, p. 1286–96, 2014.
82. MANDA, A. et al. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. **Cent Eur J Immunol**, v. 39, n. 1, p. 116–121, 2014.
83. ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. **Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications** *Acta Biochimica Polonica*, 2013.
84. CAUDRILLIER, A. et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2661–71, 2012.
85. ROSSAINT, J. et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. **Blood**, v. 123, n. 16, p. 2573–2584, 2014.

86. THOMAS, G. M. et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. **Blood**, v. 119, n. 26, p. 6335–6343, 2012.

87. BOOGAARD, R. et al. Recombinant human deoxyribonuclease in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Chest**, v. 131, n. 3, p. 788–795, 2007.

88. NASR, S. Z. et al. Efficacy of recombinant human deoxyribonuclease I in the hospital management of respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Chest**, v. 120, n. 1, p. 203–8, 2001.

89. O'DONNELL, A. E. et al. Treatment of idiopathic bronchiectasis with aerosolized recombinant human DNase I. **Chest**, v. 113, n. 5, p. 1329–1334, 1998.

FIGURAS

Figura 1

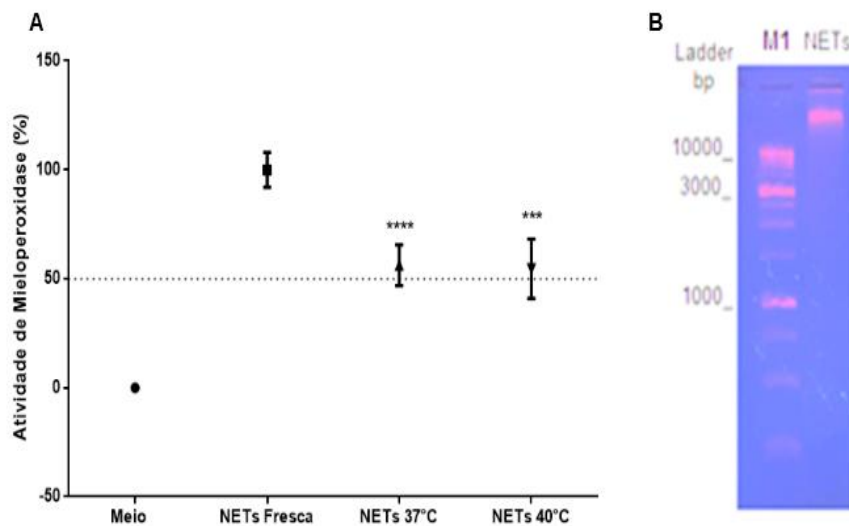


Figura 2

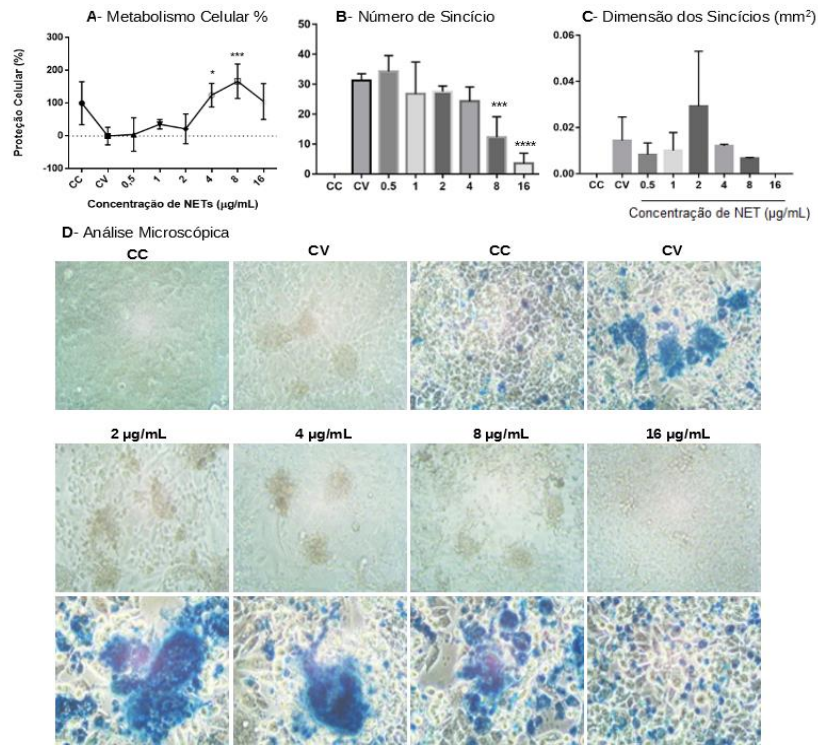


Figura 3

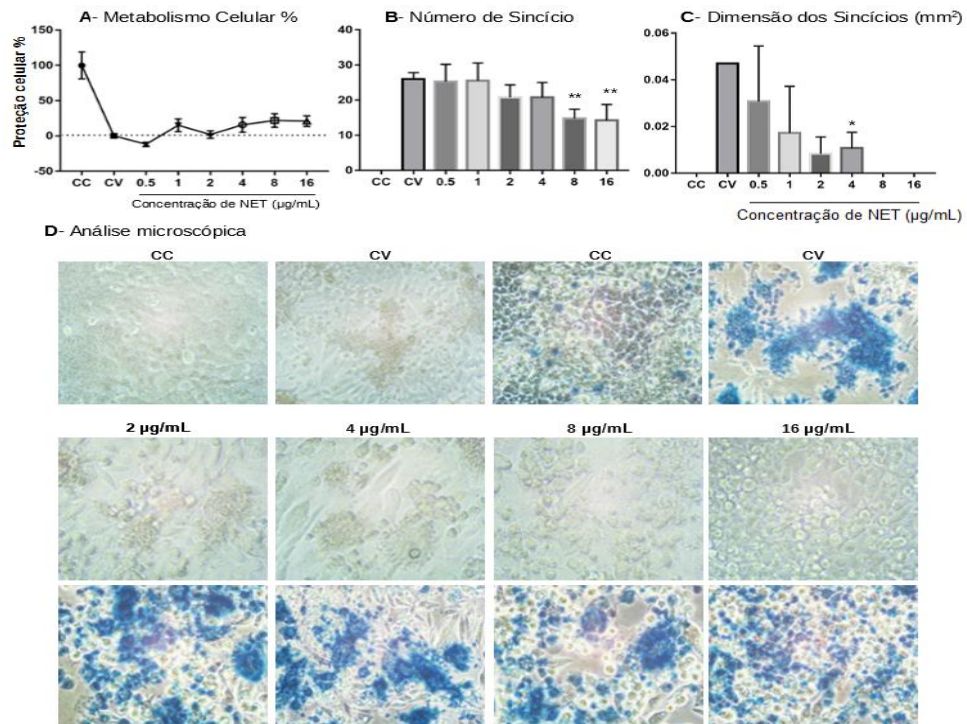


Figura 4

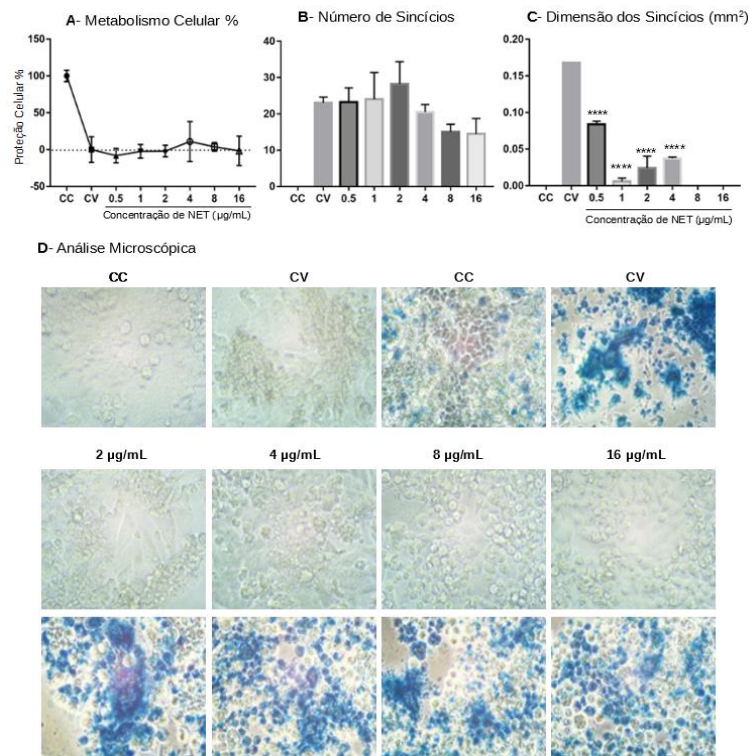


Figura 5

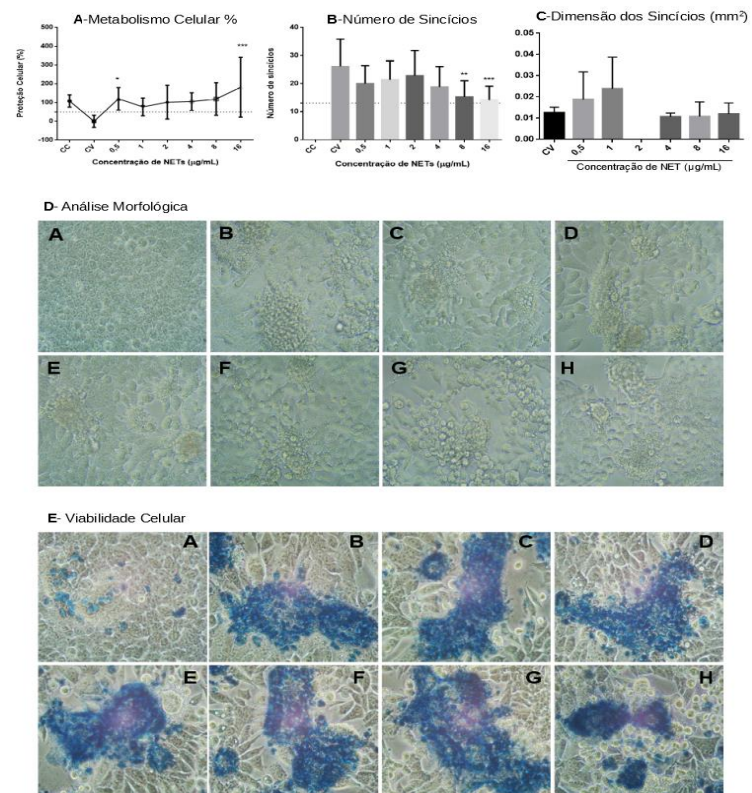


Figura 6

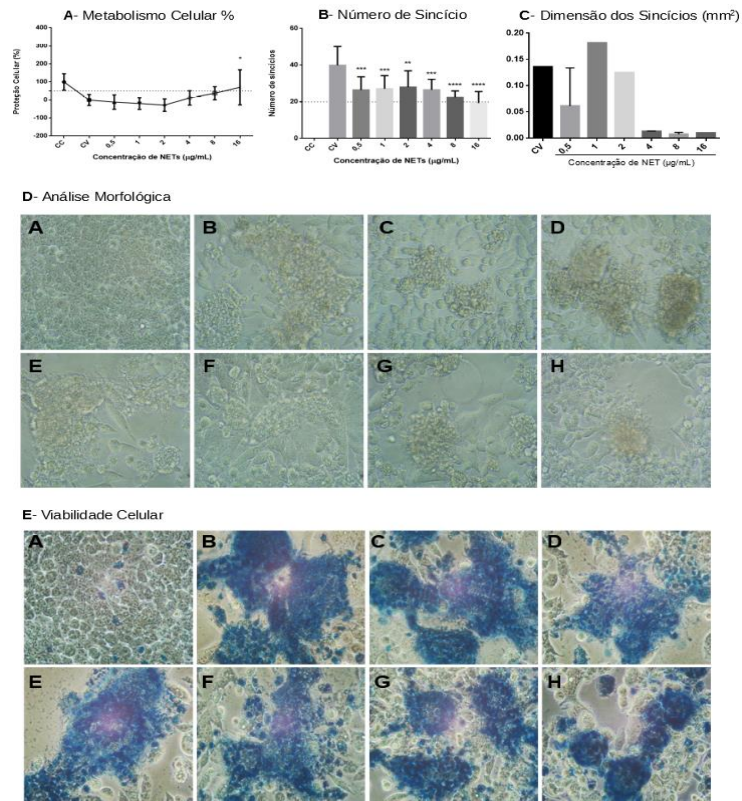


Figura 7

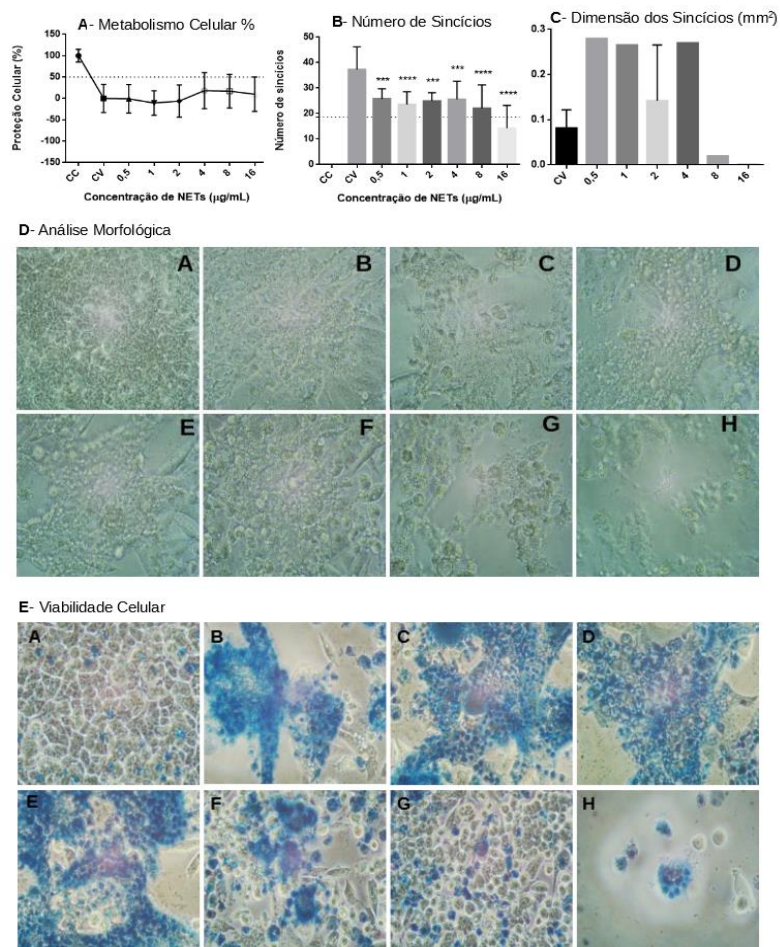


Figura 8

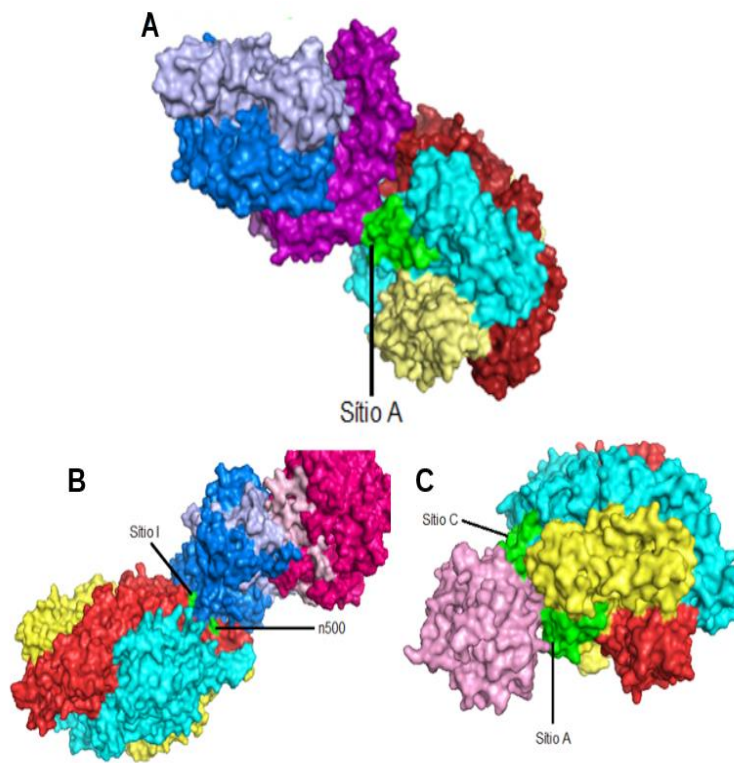
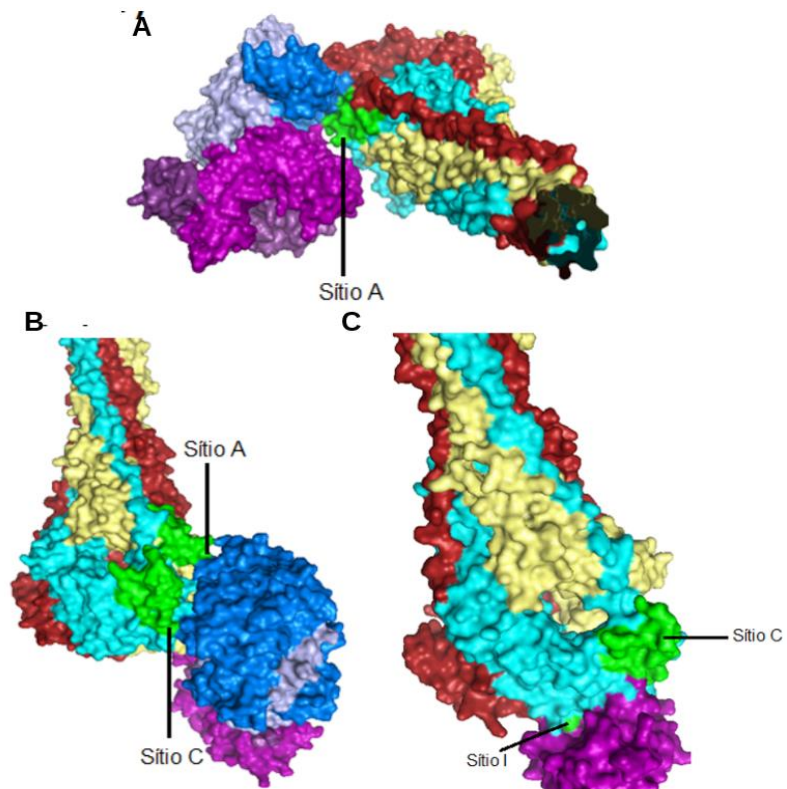


Figura 9



LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Avaliação da atividade da mieloperoxidase. (A) NETs frescas e NETs que passaram pelo período de 24h no banho-maria (à 37°C e à 40°C), foram incubadas com substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidenteína) por 1 hora. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura (RPMI sem soro), sendo as NETs frescas consideradas como controle positivo (100% de atividade). A absorbância das amostras foi feita em um leitor de microplaca em 450nm. O gráfico representa a média de experimentos realizados em triplicata, onde **** = $p < 0,0001$. (B) Análise eletroforética das NETs (40°C) em gel de agarose 1.5%, onde M1 = Marcador molecular de DNA (1kb DNA ladder).

Figura 2. Efeito das NETs no pré-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL) e infectadas com hRSV (MOI 0.1). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e viabilidade celular por incorporação de azul de trypan, onde CC corresponde a células que não receberam nenhum tipo de tratamento; CV, células que receberam apenas vírus no MOI 0.1 e células que receberam tratamento de NET nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão.

Figura 3. Efeito das NETs no pré-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL) e infectadas com hRSV (MOI 0.5). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e viabilidade celular por incorporação de azul de trypan, onde CC corresponde a células que não receberam nenhum tipo de tratamento; CV, células que receberam apenas vírus no MOI 0.5 e células que receberam tratamento de NET nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão.

Figura 4. Efeito das NETs no pré-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL) e infectadas com hRSV (MOI 1.0). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e viabilidade celular por incorporação de azul de trypan, onde CC corresponde a células que não receberam nenhum tipo de tratamento; CV, células que receberam apenas vírus

no MOI 0.1 e células que receberam tratamento de NET nas concentrações de 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão.

Figura 5. Efeito das NETs no pós-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI 0.1) e então cultivadas na presença de diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e (E) viabilidade celular por incorporação de azul de trypan. Nas imagens D e E, as letras representam a presença ou ausência dos tratamentos. Em A- células que não receberam nenhum tipo de tratamento; B- células que receberam apenas vírus; de C à H- células que receberam tratamento com NETs nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão.

Figura 6. Efeito das NETs no pós-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI 0.5) e então cultivadas na presença de diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios, (D) morfologia e (E) viabilidade celular por incorporação de azul de trypan. Nas imagens D e E, as letras representam a presença ou ausência dos tratamentos. Em A- células que não receberam nenhum tipo de tratamento; B- células que receberam apenas vírus; de C à H- células que receberam tratamento com NETs nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Os gráficos e as imagens são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos ± desvio padrão.

Figura 7. Efeito das NETs no pós-tratamento de células infectadas por hRSV. Células Hep-2 foram infectadas com hRSV (MOI 1.0) e então cultivadas na presença de diferentes concentrações de NET (0,5-16 µg/mL). No terceiro dia de cultivo foram avaliadas quanto: (A) metabolismo celular por adição do sal de MTT, (B) contagem do número de sincícios, (C) dimensão dos sincícios e (D) morfologia e (E) viabilidade celular por incorporação de azul de trypan. Nas imagens D e E, as letras representam a presença ou ausência dos tratamentos. Em A- células que não receberam nenhum tipo de tratamento; B- células que receberam apenas vírus; de C à H- células que receberam tratamento com NETs nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Os gráficos e as imagens são representativos de três

experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos representam a média dos valores obtidos \pm desvio padrão.

Figura 8. Modelo de interação por docking molecular usando a proteína F pré-fusão. Em (A) temos a interação da proteína F com o motavizumab. Em (B) temos a interação com a MPO e em (C) a interação com a catepsina G, com os sítios de interações indicados nas imagens.

Figura 9. Modelo de interação por docking molecular usando a proteína F pós-fusão. Em (A) temos a interação da proteína F com o motavizumab. Em (B) temos a interação com a MPO e em (C) a interação com a catepsina G, com os sítios de interações indicados nas imagens.