

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 05/03/2023



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

Bruno Rafael Pereira Lopes

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

São José do Rio Preto

2021

Bruno Rafael Pereira Lopes

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

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

Financiadora: CAPES

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

São José do Rio Preto

2021

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Bruno Rafael Pereira Lopes

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

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto
5 de Março de 2021

Dedico essa tese à

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

Abstract

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

Keywords: hRSV. Neutrophil extracellular traps . Antiviral.

Lista de ilustrações

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lista de tabelas

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

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

Lista de abreviaturas e siglas

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

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

Lista de símbolos

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

Sumário

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

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

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

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

1 Introdução

1.1 Epidemiologia

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

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

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

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

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

1.2 O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)

1.2.1 Histórico

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

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

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

1.2.2 Taxonomia e nomenclatura

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

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

1.2.3 Genoma e estrutura

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

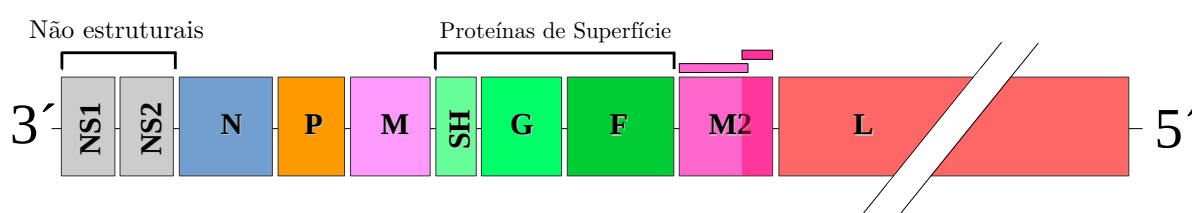


Figura 1 – Esquema da distribuição dos genes do hRSV. O hRSV possui 10 genes, destacado em tons de verde as proteínas transmembrana que medeiam as etapas iniciais do processo de adesão e internalização. Fonte: o autor.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

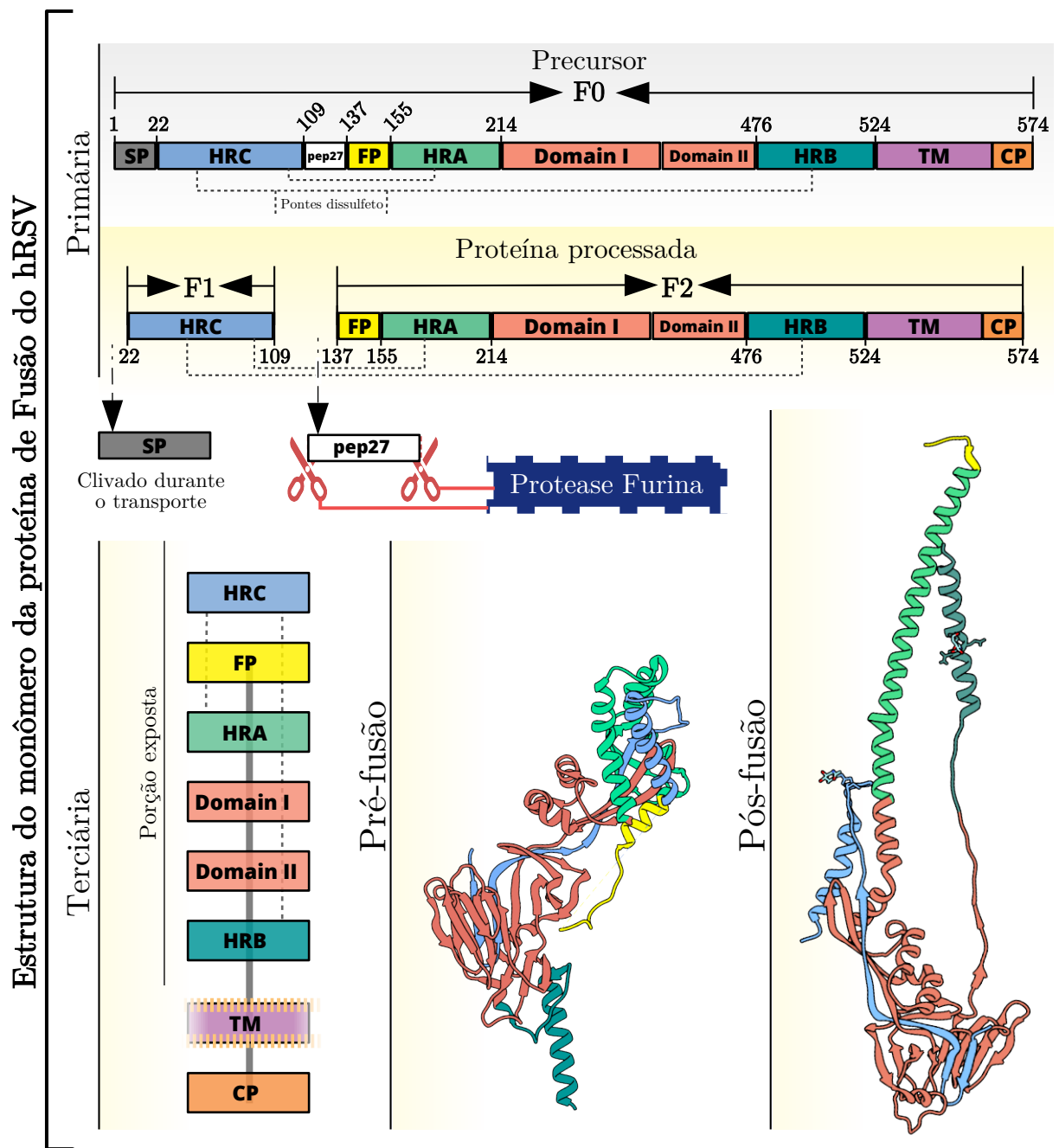


Figura 2 – Detalhe da estrutura da proteína F. A proteína F é traduzida como precursor F0, o peptídeo de sinal (SP) é clivado ainda no transporte intracelular. A proteína passa ainda por mais duas clivagens que culminam na liberação de um pequeno peptídeo solúvel (pep27), induzindo a transição da conformação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

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

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

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

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

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

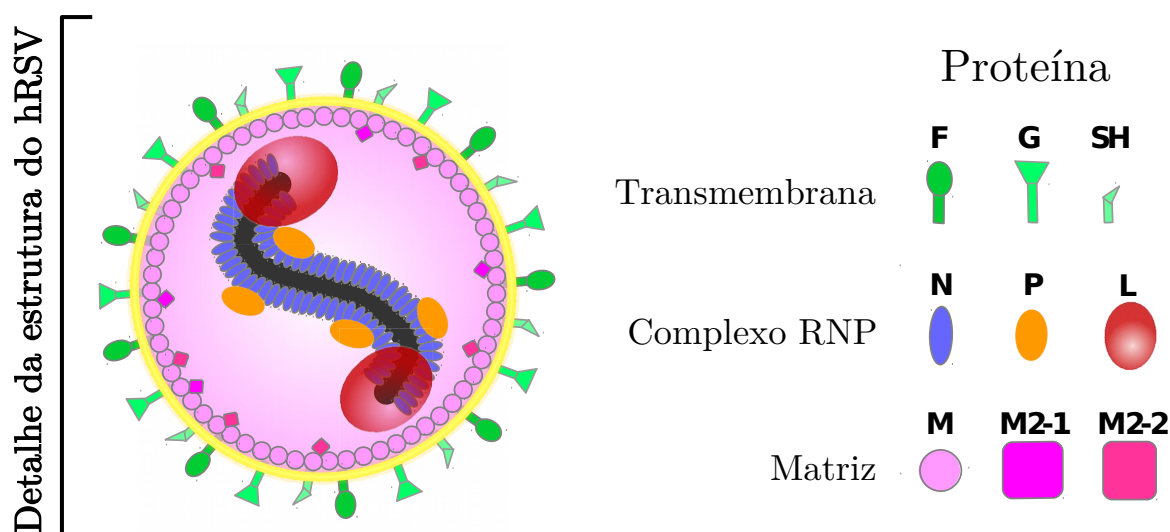


Figura 3 – Esquema de distribuição das proteínas estruturais do hRSV. As proteínas transmembrana (também denominadas proteínas de superfície) F, G e SH medeiam as etapas iniciais da infecção (adesão e internalização). Fonte: o autor.

1.2.4 Ciclo replicativo

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

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

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

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

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

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

1.2.5 Patologia

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Neutrófilos e a infecção por hRSV

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

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

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

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

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

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

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

1.3.1 Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas (NETs)

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

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

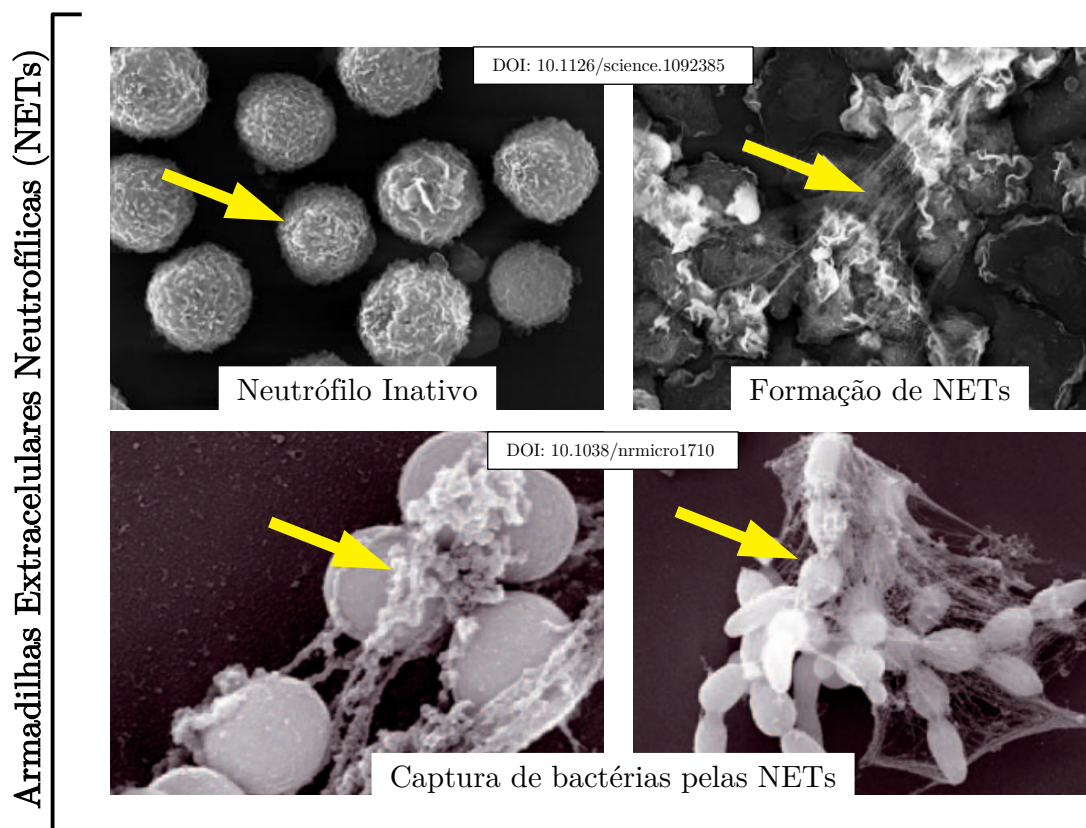


Figura 4 – Aspecto das Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas (NETs). Sob certos estímulos, neutrófilos iniciam o mecanismo de liberação das NETs, formando estruturas capazes de capturar e/ou inativar microorganismos. Fonte: adaptado de Brinkmann et al.^[1] e Brinkmann e Zychlinsky^[2].

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

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

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

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

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

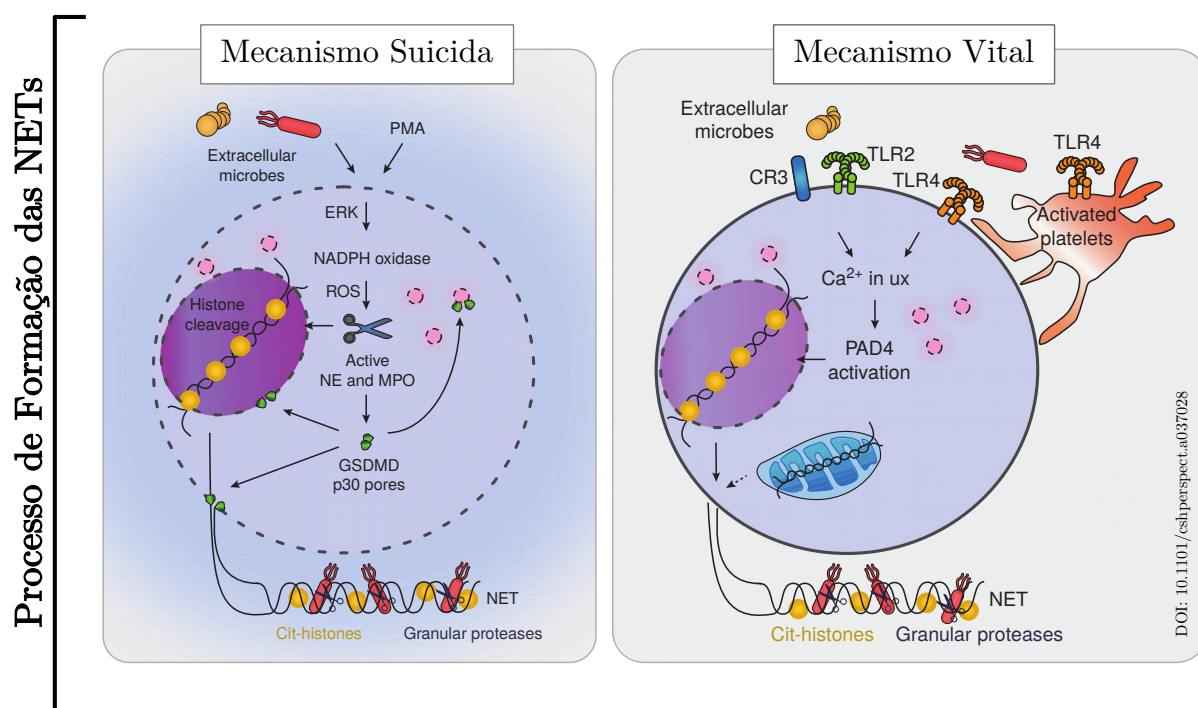


Figura 5 – Principais tipos de liberação das NETs. Sob determinados estímulos, alguns neutrófilos desencadeiam alterações intra e extracelulares, liberando parte do seu material genético imiscuído em conteúdo granular. Fonte: adaptado de Burgener e Schroder^[3].

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

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

1.3.2 Enzimas Granulares

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lavados brônquicos de pacientes com infecção respiratória aguda contém

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

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

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

1.4 Tratamento das Infecções Causadas por hRSV

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8 Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 160 GUERRA, M. et al. Cathepsin G Activity as a New Marker for Detecting Airway Inflammation by Microscopy and Flow Cytometry. *ACS Central Science*, v. 5, n. 3, p. 539–548, 2019. ISSN 23747951. Citado na página 111.
- 161 DURANTON, J. et al. DNA strongly impairs the inhibition of cathepsin G by α 1- antichymotrypsin and α 1-proteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 6, p. 3787–3792, 2000. ISSN 00219258. Citado na página 111.
- 162 RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 6, p. 3988–3994, 2007. ISSN 0022-1767. Citado na página 113.
- 163 HOUGHTON, A. M. G. et al. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature*, v. 460, n. 7255, p. 637–641, 2009. ISSN 00280836. Citado na página 113.
- 164 KOEHL, C.; KNIGHT, C. G.; BIETH, J. G. Compared Action of Neutrophil Proteinase 3 and Elastase on Model Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 15, p. 12609–12612, apr 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M210074200>>. Citado na página 113.
- 165 KORKMAZ, B. et al. Design and use of highly specific substrates of neutrophil elastase and proteinase 3. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2004. ISSN 10441549. Citado na página 113.
- 166 BELAAOUAJ, A. et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine*, 1998. ISSN 10788956. Citado na página 113.
- 167 BELAAOUAJ, A. A.; Kwang Sik Kim; SHAPIRO, S. D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science*, v. 289, n. 5482, p. 1185–1187, 2000. ISSN 00368075. Citado na página 113.
- 168 PHAM, C. T. *Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation*. 2006. Citado na página 113.
- 169 HEUBERGER, D. M.; SCHUEPBACH, R. A. Correction to: Protease-activated receptors (PARs): Mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases (Thrombosis Journal (2019) 17: 4 DOI: 10.1186/s12959-019-0194-8). *Thrombosis Journal*, Thrombosis Journal, v. 17, n. 1, p. 1–24, 2019. ISSN 14779560. Citado na página 113.

170 PAPAYANNOPOULOS, V.; STAAB, D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving dnase therapy. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, p. 1–7, 2011. ISSN 19326203. Citado na página 113.

171 SERVICE, P. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *Research in Microbiology*, v. 158, n. 7, p. 553–554, 2007. ISSN 09232508. Citado na página 125.

172 WEN, Z. et al. Development and application of a higher throughput RSV plaque assay by immunofluorescent imaging. *Journal of Virological Methods*, Elsevier, v. 263, n. April 2018, p. 88–95, 2019. ISSN 18790984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.022>>. Citado na página 127.

173 LOPES, B. R. P. et al. Diagnosis and treatment of HEp-2 cells contaminated with mycoplasma. *Brazilian Journal of Biology*, 2020. ISSN 1519-6984. Citado na página 129.