

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

STÉFANIE PRIMON MURARO

**O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO INDUZ NETOSE CLÁSSICA ROS-DEPENDENTE
ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE PAD4 E DAS VIAS DE NECROPTOSE**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

STÉFANIE PRIMON MURARO

**O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO INDUZ NETOSE CLÁSSICA ROS-
DEPENDENTE ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE PAD4 E DAS VIAS DE
NECROPTOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina da PUCRS
para obtenção de título de Mestre em
Medicina/Pediatria.

Prof. Dra. Bárbara Nery Porto

Porto Alegre, 2018

Ficha Catalográfica

M972v Muraro, Stéfanie Primon

O vírus sincicial respiratório induz NETose clássica ROS-dependente através da ativação de PAD4 e das vias de necroptose / Stéfanie Primon Muraro . – 2018.

58 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara Nery Porto.

1. NETose clássica. 2. Necroptose. 3. MAPK- proteíno-quinases ativadas por mitógeno. 4. Vírus respiratório. 5. Células epiteliais. I. Porto, Bárbara Nery. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

STÉFANIE PRIMON MURARO

**O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO INDUZ NETOSE CLÁSSICA ROS-
DEPENDENTE ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE PAD4 E DAS VIAS DE
NECROPTOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Cristina Beatriz C. Bonorino- PUCRS

Prof. Dra Ana Paula Duarte de Souza – PUCRS

Prof. Dra Karina Alves de Toledo – UNESP

Prof. Dra. Bárbara Nery Porto - PUCRS (orientadora)

Porto Alegre

2018

RESUMO

O vírus sincicial respiratório (VSR) é uma das principais causas de doenças do trato respiratório em humanos sendo associado principalmente com bronquiolite, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e exacerbação de asma. O VSR infecta principalmente células epiteliais pulmonares e, uma vez que a infecção é estabelecida, uma resposta imune inata é desencadeada e ocorre o recrutamento de células do sistema imune, principalmente neutrófilos. Os neutrófilos podem liberar redes extracelulares de neutrófilos (NETs) capazes de capturar e inativar uma grande quantidade de microrganismos devido à sua composição e natureza fibrosa das fibras de DNA. Recentemente, foi demonstrado que partículas do VSR além da proteína de fusão (F) do vírus foram capazes de induzir a liberação de NETs revestidas com elastase neutrofílica e mieloperoxidase, ambos peptídeos com atividade antimicrobiana. Além disso, observou-se que a formação excessiva de NETs pode ter consequências negativas para o hospedeiro, como a obstrução das vias aéreas durante a infecção por VSR. Portanto, o objetivo foi avaliar os mecanismos envolvidos na formação de NET induzida pela infecção por RSV em neutrófilos humanos, células epiteliais alveolares (A549) ou fibroblastos pulmonares (MRC5). Neutrófilos humanos foram infectados com VSR e foram capazes de induzir a liberação de NETs somente após 3 horas de infecção, indicando uma NETose clássica. Em seguida, foi caracterizada a formação de NETs durante a infecção associando a extrusão de DNA com as proteínas MPO, NE e com a proteína F do VSR. Também se observou a dependência de NADPH oxidase e PAD4 e das vias de sinalização PI3K / AKT, ERK e p38 MAPK durante a infecção. A inibição dessas vias de sinalização, da produção de PAD4 e de EROs aboliu a formação de NET. Considerando um possível envolvimento da necroptose na produção de NETs, foram utilizados inibidores de MLKL e RIPK1 e foi avaliada a liberação de LDH no sobrenadante de neutrófilos infectados. Os neutrófilos liberaram LDH e dependeram da ativação da necroptose para produzir NETs. Do mesmo modo, os neutrófilos foram co-cultivados com células A549 ou MRC5 infectadas com VSR. Ambas as células A549 e MRC5 desencadearam a liberação de NET por neutrófilos humanos de uma maneira dependente da concentração de vírus, o oposto ocorreu quando usado um vírus UV-inativado. Resumidamente, o VSR induz a NETose clássica / dependente de EROs em neutrófilos humanos, e este efeito depende de atividade específica de quinases. Além

disso, os neutrófilos são capazes de reconhecer células pulmonares infectadas pelo VSR, induzindo a liberação NETs. Assim, o controle de liberação de NETs pode ser crucial para minimizar a inflamação do tecido causada pela infecção por VSR.

Palavras-chave: NETose clássica; Necroptose; MAPK- proteíno-quinases ativadas por mitógeno; vírus respiratório; células epiteliais.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of diseases of the respiratory tract in humans being mainly associated with bronchiolitis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma exacerbation. RSV infection occurs primarily in pulmonary epithelial cells and, once infection is established, an innate immune response is triggered and mainly neutrophil recruitment is induced. Neutrophils can extrude neutrophil extracellular traps (NETs) capable of entrapping and inactivate a multitude of microorganisms because of its composition and due to the stringy nature of DNA fibers. Recently, was demonstrated that RSV particles and its fusion (F) protein were able to induce the release NETs coated with neutrophil elastase and myeloperoxidase, both antimicrobial peptides. Also, was observed that the excessive formation of NETs can have negative consequences to the host, such as airway obstruction during RSV infection. Therefore, the aim was to evaluate the mechanisms involved in NET formation induced by RSV infection of neutrophils, alveolar epithelial cells (A549) or lung fibroblasts (MRC5). Human neutrophils were infected with RSV and were able to induce NETs release only after 3 hours of stimulation indicating classical NETosis. Next was characterized NETs formation during infection associating DNA extrusion with MPO, NE and F protein of RSV. Was also observed NADPH oxidase and PAD4 dependence and PI3K/AKT, ERK and p38 MAPK pathways during infection. The inhibition of these signaling pathways, PAD4 and ROS production abolished NET formation. Considering a possible involvement of necroptosis during NETs production, were tested MLKL and RIPK inhibitors and evaluated LDH release in the supernatant of infected neutrophils. Neutrophils released LDH and depend on necroptosis induction to produce NETs. Likewise, neutrophils were co-cultured with A549 or MRC5 cells infected with RSV. Both A549 and MRC5 cells triggered NET release by human neutrophils in a virus concentration-dependent manner, the opposite occurs when used UV-inactivated virus. Briefly, RSV induces the classical/ROS-dependent NETosis by human neutrophils, and this effect relies on specific kinases activity. Furthermore, neutrophils are able to recognize pulmonary cells infected by RSV, releasing NETs. Thus, NETs release control could be crucial for minimizing tissue inflammation caused by RSV infection.

Keywords: classical NETosis; necroptosis; MAPK- mitogen-activated protein kinase; respiratory virus; epithelial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral da NETose.....	16
Figura 2 - Mecanismos de patologia mediada por NET.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
C5a	Fator do complemento 5 ^a
CCL	Ligante de quimiocina (C-C)
CXCL	Ligante de quimiocina (C-X-C)
DC	Célula dendrítica
DPOC/COPD	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROS/ROS	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN	Interferon
IL-()	Interleucina
IP-10	Proteína 10 indutora de interferon-gama
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MLKL	Domínio quinase de linhagem mista
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
NE	Elastase neutrofílica
NET	Redes extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Célula <i>natural killer</i>

NLRs	Receptores do domínio de oligomerização de nucleotídeo-ligante
PAD4	Peptidil arginina deaminase tipo 4
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
Raf	Quinase específica para serina/treonina
RIPK	Proteína serina/treonina quinase de interação com receptor
RLRs	Receptores do gene rig-I induzidos pelo ácido retinóico
Th	Célula T auxiliar
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
VSR/RSV	Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR)	12
2.1.1. Características virais	12
2.1.2 Resposta imune inata	13
2.2 REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS	14
2.2.1 Mecanismos e características da NETose	14
2.2.2 NETose e patogênese viral	16
3 JUSTIFICATIVA.....	19
4 OBJETIVOS.....	20
5 HIPÓTESE	21
6 METODOLOGIA	22
7 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	31
ANEXO A - Aprovação SIPESQ	34
ANEXO B - Aprovação CEP	35
ANEXO C - Artigo Científico	38

1 INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas virais são uma causa comum de morbidade em crianças e pacientes imunodeprimidos, sendo patogênicas sozinhas ou associadas a co-infecções.¹ Vírus respiratórios tais como paramixovirus, rinovírus, coronavírus e ortomixovirus são os principais causadores de doenças do trato respiratório em humanos.^{2,3}

O vírus sincicial respiratório (VSR) é uma das principais causas de infecção do trato respiratório e a cada ano uma amostra considerável de crianças estará susceptível a pelo menos um episódio de bronquiolite viral. No Brasil, ocorreu um aumento de quase 40% no número de crianças positivas para o VSR em dez anos.⁴

A infecção pelo VSR pode apresentar sintomatologia leve quando atinge apenas o trato respiratório superior com manifestações tais como coriza, otite e rinite. A dispersão viral para o trato respiratório inferior, contudo, afeta gravemente as vias respiratórias exigindo oxigenoterapia, ventilação mecânica e podendo levar à morte.^{5,6}

Atualmente, são administrados anticorpos monoclonais aos grupos de risco e o tratamento é principalmente assintomático além de não haver uma vacina eficaz disponível.

O VSR infecta preferencialmente células superficiais do epitélio respiratório e desencadeia uma resposta imune inata caracterizada pelo estabelecimento de uma resposta antiviral e liberação de quimiocinas e citocinas. A resposta inflamatória promoverá o recrutamento de células imunes da corrente sanguínea para o tecido infectado e a ativação de células residentes.⁷⁻¹² A interleucina (IL)-8 é liberada durante a infecção, sendo a mais potente quimiocina de neutrófilos, com papel central no influxo de neutrófilos para as vias respiratórias durante a infecção pelo VSR.¹³

Os neutrófilos participam da resposta inata atuando na fagocitose de patógenos, liberando grânulos contendo peptídeos antimicrobianos e liberando redes extracelulares. O processo de formação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs) é conhecido como NETose sendo uma estratégia antimicrobiana que pode levar a morte de neutrófilos, devido à exposição a peptídeos antimicrobianos, e contribui para o controle e eliminação de patógenos. Contudo, uma produção excessiva de NETs contribui para a patologia de infecções virais respiratórias.^{14,15}

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR)

O vírus sincicial respiratório (VSR) é um dos principais causadores de doenças do trato respiratório em humanos, principalmente bronquiolite, atingindo principalmente crianças menores de 2 anos e pacientes imunodeprimidos.^{2,16} Um estudo brasileiro com duas cortes de crianças de até 12 meses mostrou que ocorreu um aumento de 33,1% para 70,3% no número de pacientes positivos para VSR diagnosticados com bronquiolite viral aguda.⁴

A infecção pelo VSR pode se manifestar de forma branda com coriza, otite ou rinite podendo progredir para manifestações mais graves necessitando hospitalização, oxigenoterapia e ventilação mecânica quando atinge o trato respiratório inferior e contribuindo para a exacerbação da COPD e asma.^{5,6}

Em 1960, ocorreram testes para a fabricação de uma vacina contra o VSR utilizando o vírus inativado com formalina. As crianças vacinadas com a forma inativada do vírus apresentaram uma resposta pulmonar exacerbada com complicações graves e exigindo hospitalização.¹⁷ A resposta imune desencadeada pela vacina não foi compreendida inicialmente, mais tarde estudos comprovaram que a resposta desencadeada era do tipo Th2 (T auxiliar) no qual ocorre grande infiltração de eosinófilos e neutrófilos no pulmão devido ao perfil de citocinas liberadas por essas células, essa resposta acabou contribuindo para a piora da doença nessas crianças.^{18,19}

De forma profilática, é administrado um anticorpo monoclonal neutralizante para o vírus, chamado palivizumabe, às crianças prematuras e pacientes imunocomprometidos considerados grupos de alto risco. O tratamento da infecção é realizado de acordo com as manifestações sintomáticas apresentadas pelo paciente.

2.1.1. Características virais

O VSR pertencia à família *Paramyxoviridae*, sendo recentemente realocado para a família *Pneumoviridae*.²⁰ O VSR é um vírus envelopado e de genoma linear RNA fita-simples de sentido negativo com genoma capaz de codificar nove proteínas estruturais (F, G, SH, M, N, P, L, M2-1 e M2-2) e duas não-estruturais (NS1 e NS2). As proteínas NS1 e NS2 junto com as glicoproteínas G e F, são os principais

componentes envolvidos na adesão e fusão do vírus à membrana, no estabelecimento da infecção e na evasão da resposta imune do hospedeiro.^{11,21,22}

A infecção pelo VSR ocorre pelas vias aéreas afetando principalmente o epitélio bronquioalveolar. Durante a infecção, as células infectadas perdem a morfologia original e são capazes de formar grandes aglomerados celulares chamados sincícios.^{23,24} In vitro, o VSR pode infectar outros tipos de linhagens celulares não sendo necessariamente limitada ao tecido de origem.²⁵

2.1.2 Resposta imune inata

Uma vez estabelecida a infecção nas vias aéreas, ocorre excessiva secreção de muco, depósito de fibrina e outros materiais que auxiliam na destruição do epitélio alveolar e no acúmulo de células polimorfonucleares (PMNs) no lúmen que contribuem para a obstrução das vias aéreas.^{23,26,27} Com o estabelecimento da resposta inflamatória são liberadas quimiocinas capazes de promover o recrutamento de células para o pulmão dentre elas, CCL5, CCL2 (proteína quimiotática de monócitos-1/MCP-1), CXCL8 (Interleucina-8; IL-8) e CXCL10 (IP-10/ proteína 10 indutora de interferon-gama). Os neutrófilos são as células encontradas em maior quantidade, no entanto também ocorre o recrutamento de monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NKs), células T de memória e eosinófilos, que conseqüentemente irão liberar outras citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias.^{7-12,25} Contudo, não está precisamente estabelecido como ocorre a interação entre o VSR e os neutrófilos.

A infecção das células pelo VSR desencadeia a ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B), promovendo uma resposta antiviral.^{28,29} O reconhecimento viral pode ocorrer através da ligação de partículas ou proteínas virais à receptores de superfície, endossomais ou citoplasmáticos conhecidos como: PRRs (receptores de reconhecimento de padrão), TLRs (receptores do tipo Toll), RLRs (receptores do gene rig-I induzidos pelo ácido retinóico) ou NLRs (receptores do domínio de oligomerização de nucleotídeo-ligante).^{12,25,30} Esses receptores, citocinas/quimionas e interações célula-célula irão auxiliar posteriormente no estabelecimento da resposta imune adaptativa.

Entretanto, o VSR possui mecanismos de evasão do sistema imune que ocorre, principalmente através da diminuição de IFN que é essencial para a resposta imune inicial, e que acaba comprometendo a geração de células de memória com potencial

efetivo de eliminar o vírus em uma próxima infecção.³¹⁻³⁵ Assim, é comum reinfecções e o VSR se torna um risco considerando que não há vacinas e tratamentos específicos para serem administrados caso haja um surto da doença.

2.2 REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são células polimorfonucleares (PMNs) do sistema imunológico inato, responsáveis pela primeira linha de defesa contra patógenos. Os neutrófilos são as células efetoras mais abundantes do sistema inato e estão providos de diversos mecanismos de defesa, tais como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), liberação de grânulos contendo moléculas com ação antimicrobica, fagocitose e, o mecanismo mais recente, produção de redes extracelulares de neutrófilos (*NETs* – do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*).^{14,15}

2.2.1 Mecanismos e características da NETose

As NETs parecem ser um mecanismo de defesa inata essencial para a defesa do hospedeiro. As redes auxiliam no aprisionamento de vírus e bactérias devido a sua consistência pegajosa e, junto com proteínas antimicrobianas, são capazes de imobilizar e até inativar microrganismos. A estrutura das redes consiste basicamente em cromatina de origem mitocondrial ou nuclear associada às proteínas encontradas no citoplasma dos neutrófilos tais como mieloperoxidase, elastase neutrofílica, catepsina G, e defensinas além de histonas provenientes do núcleo.^{36,37}

A produção de redes extracelulares de neutrófilos foi inicialmente considerada uma forma de morte, com mecanismos diferentes da apoptose e necrose observada em resposta ao estímulo com PMA, sendo então chamada de NETose ou posteriormente NETose suicida.³⁶ O mecanismo de NETose descrito envolvia a ativação da via raf-MEK-ERK, a descondensação da cromatina seguido da permeabilização da membrana celular e extravasamento do conteúdo nuclear, envolto a proteínas presentes no citoplasma, para o espaço extracelular. Esse processo poderia ocorrer dentro de minutos a horas.^{36,38-40} Além disso, a enzima NADPH oxidase participava na formação das NETs através da produção de EROS que auxiliariam na liberação de enzimas granulares para o citoplasma tais como MPO e NE.^{36,38,39} A NE translocada para o núcleo é capaz de degradar histonas e junto com a MPO promovem a descondensação da cromatina que será então liberada pelo neutrófilo para a formação das NETs. Além disso, EROS pode promover a citrulinização das histonas pela enzima peptidil arginina deaminase tipo 4 (PAD4), um

processo independente da NE.^{14,41-43} Outra proteína que pode estar envolvida no processo de NETose, recentemente indentificada, é a DEK que é capaz de se ligar a cromatina e promover a descondensação, assim como MPO e PAD4.⁴⁴

Mais recentemente, uma rota alternativa de NETose que não envolvia a morte do neutrófilo foi identificada e chamada de NETose vital ou não-lítica.^{45,46} Yousefi e colaboradores⁴⁷ mostraram *in vitro* que neutrófilos permaneciam viáveis após gerarem as NETs em resposta ao fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF) e subsequente TLR4 ou em resposta a estimulação do receptor do fator do complemento 5a (C5a). Ainda, o DNA liberado era de origem mitocondrial e dependia de EROs.⁴⁷ Clark e colaboradores⁴⁸, também mostraram que os neutrófilos interagem fortemente com plaquetas, provenientes de pacientes com sepse, de forma dependente de TLR4 e induziam a formação de NETs sendo esse um mecanismo de aprisionamento bacteriano. Além disso, os neutrófilos foram capazes de reter o marcador de DNA mostrando que os neutrófilos poderiam continuar vivos mesmo após a liberação das redes.⁴⁸ Pilszczek e colabores⁴⁵ descreveram o mecanismo envolvido na NETose vital em resposta ao *Staphylococcus aureus*. Durante o processo, ocorre a formação de vesículas preenchidas com DNA nuclear e estas são liberadas sem que ocorra ruptura da membrana celular. O processo ocorre rapidamente, é independente da produção de EROs pela NADPH oxidase e contribui para o aprisionamento da bactéria.⁴⁵ A NETose vital auxilia a conter infecções locais uma vez que os neutrófilos podem rapidamente liberar as redes e continuar com as funções de quimiotaxia e fagocitose de patógenos. Yipp e colabores⁴⁶ visualizaram *in vivo* uma rápida formação de NETs em resposta a bactérias gram-positivas. As PMNs, após a liberação das NETs, permaneciam vivas com um núcleo anormal ou anucleadas e ainda funcionais.⁴⁶

Em suma, a NETose pode levar horas (clássica ou tardia) ou minutos (rápida) para que ocorra, ser suicida ou vital (dependendo do estímulo empregado) e ser dependente ou não da produção de EROs (Figura 1).

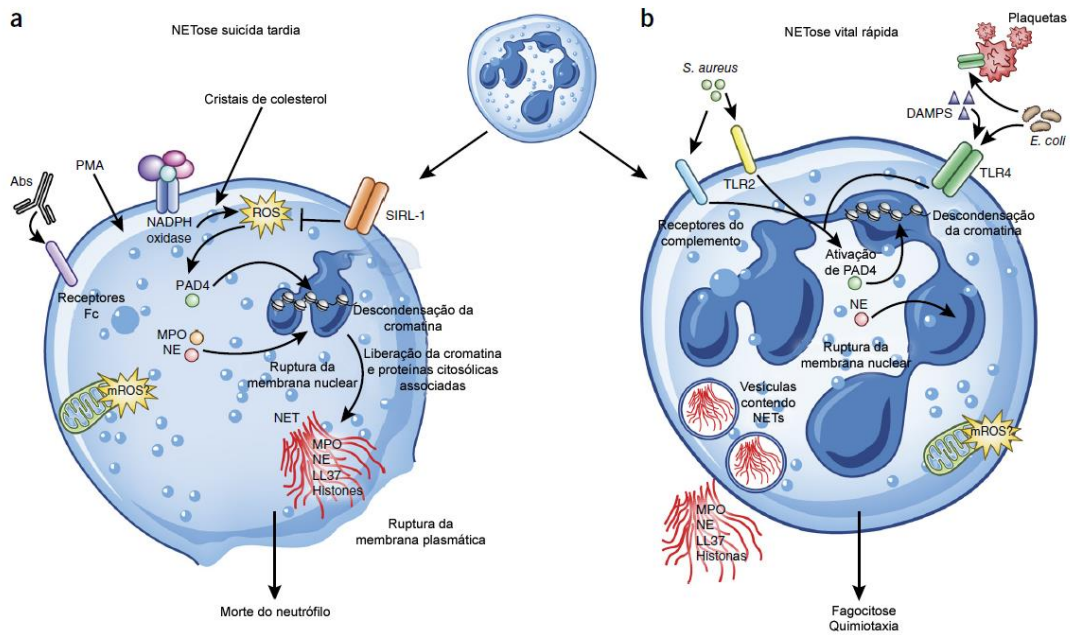


Figura 1 Visão geral da NETose. (a) Estímulos diferentes, tais como PMA, (auto) anticorpos (Abs), ou cristais de colesterol, induzem a NETose suicida, que ocorre após horas de estimulação. Após a ativação da NADPH oxidase, ocorre a produção de ROS e PAD4 é ativado, o que resulta na descondensação da cromatina. Posteriormente, a elastase neutrofílica (NE) e a mieloperoxidase (MPO) são translocadas para o núcleo para promover um maior desdobramento da cromatina, resultando na ruptura da membrana nuclear. A cromatina é liberada para o citosol, onde é envolta a proteínas granulares e citosólicas. Finalmente, as NETs são liberados através da ruptura da membrana plasmática, e os neutrófilos morrem. (b) A NETose vital é induzida em poucos minutos por *S. aureus* através dos receptores do complemento e dos ligantes de TLR2, ou por *E. coli* diretamente via TLR4 ou indiretamente através de plaquetas ativadas por TLR4. PAD4 é ativado, talvez sem necessidade de oxidantes, e induz a descondensação da cromatina. Como na NETose suicida, NE é translocada para o núcleo para promover um maior desdobramento da cromatina e ruptura da membrana nuclear. No entanto, a cromatina envolta em proteínas é expelida através de vesículas, e o neutrófilo permanece vivo para outras funções, como por exemplo, a fagocitose. Como a produção de ROS mitocondrial está envolvida em uma ou outras formas de NETose ainda não foi completamente elucidado. Fonte: Adaptado de Jorch.⁵⁰

2.2.2 NETose e patogênese viral

Apesar de inicialmente ser um mecanismo descrito em resposta a grandes microrganismos tais como *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Leishmania amazonensis*, estudos posteriores demonstraram que vários patógenos podem induzir a liberação de NETs incluindo vírus.^{36,50,51}

Uma formação de NETs desregulada está associada a diversas condições patológicas tais como distúrbios respiratórios, doenças autoimunes, sepse dentre outras (Figura 2).^{14,52} As NETs contêm diversos componentes que ao mesmo tempo que possuem atividade antimicrobiana, podem causar danos a tecidos e contribuir para anomalias patológicas. Existem várias evidências, que sugerem que há uma ligação potencial de NETs com o dano causado por diversos vírus.

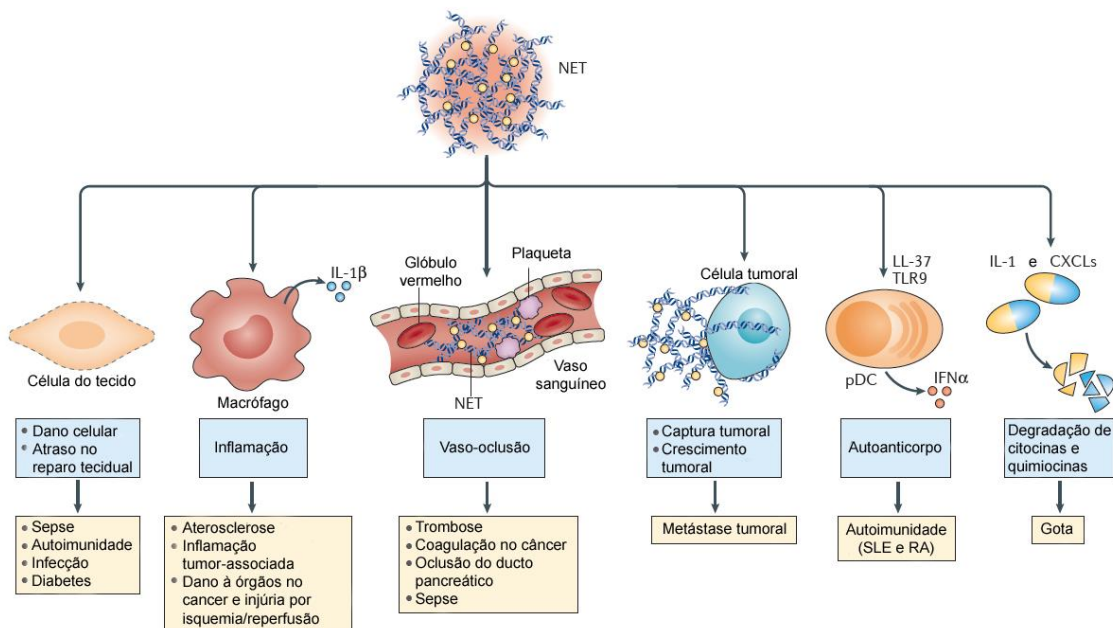


Figura 2 Mecanismos de patologia mediada por NET. As redes extracelulares de neutrófilos (NETs) são patológicas em várias condições através de vários mecanismos. O dano celular direto está associado à infecções, sepse, autoimunidade e diabetes. Permitindo que os macrófagos participem da resposta inflamatória, as redes levam a aterosclerose. O aumento da propensão à NETose promove inflamação e danos aos órgãos no câncer e lesão de isquemia-reperfusão. A formação de NETs na circulação promove coagulação, oclusão vascular e trombose. A NETs presentes nos capilares também podem capturar e, potencialmente através de outros mecanismos, promover metástases tumorais. Finalmente, embora as NETs possam promover a inflamação, um acúmulo de NETs promove a resolução da inflamação através da degradação de citocinas e quimiocinas. CXCLs, ligantes CXC-quimiocinas; IFN α , interferon- α ; pDC, célula dendrítica plasmocitóide; AR, artrite reumatóide; LES, lúpus eritematoso sistêmico; TLR9, receptor do tipo *Toll* 9. Fonte: Adaptado de Papayannopoulos.¹⁴

Saitoh e colaboradores³⁷ mostraram que neutrófilos, através do reconhecimento viral pelos receptores TLR7 e TLR8, liberam NETs capazes de capturar e eliminar o vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1. A resposta antiviral ocorre pela presença de MPO e α -defensinas nas redes extracelulares.³⁷ Já, Narasaraju et al.⁵³ sugeriu um potencial dano no pulmão devido a formação de NETs durante a infecção pelo vírus influenza. As NETs encontravam-se aderidas ao epitélio alveolar nas áreas de dano tecidual e ocluindo bronquíolos em um modelo murino.⁵³

Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou o papel das histonas extracelulares, que é um dos principais componentes das NETs, durante a infecção pelo vírus influenza, encontradas em grandes quantidades em lavados nasais de pacientes infectados. Ainda, observou-se que apesar das histonas serem capazes de inibir o crescimento viral *in vitro*, o tratamento com histonas aumentou o dano pulmonar e não apresentou atividade antiviral em um modelo murino.⁵⁴ Toussaint et al.⁵⁵ correlacionou a presença de DNA e a exacerbação da asma durante a infecção por rinovírus em um modelo animal. O rinovírus é capaz de levar a formação de NETs mesmo que os neutrófilos não sejam um alvo para infecção viral, e a utilização de enzimas que quebram a cadeia de DNA, tais como a DNase, ajudaria a evitar a patologia exacerbada associada à infecção.⁵⁵

Outro vírus no qual as NETs possuem um papel fundamental é o vírus sincicial respiratório. Nosso grupo mostrou previamente que a proteína F do vírus é capaz de induzir a formação de NETs através da ligação ao receptor TLR4.⁵⁶ No trabalho de Cortjens e colaboradores⁵⁷, foi identificado no fluido bronqueoalveolar de crianças com infecção severa por VSR a formação de NETs, além de observar a formação de NETs e obstrução das vias aéreas em bezerros infectados. Ainda, essas redes extracelulares estariam capturando partículas virais.⁵⁷

Durante a resposta antiviral, as NETs contribuem alertando o sistema imune, capturando e até mesmo inativando patógenos, sendo assim uma resposta essencial para o hospedeiro. Contudo, a produção excessiva ou a ausência de *clearance* das redes extracelulares é patogênico.

3 JUSTIFICATIVA

O vírus sincicial respiratório (VSR) é a principal causa de infecções respiratórias em crianças com alta prevalência e distribuição mundial sendo associado principalmente à bronquiolite. A bronquiolite viral é caracterizada, histologicamente, por necrose epitelial e infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, nos tecidos pulmonares e vias respiratórias. O dano causado no tecido pulmonar, em resposta à infecção pelo VSR, ocorre devido à produção em massa de mediadores inflamatórios, ativação exacerbada da resposta imune e escape viral. Em um estudo publicado pelo nosso grupo, vimos que o VSR induz a formação de NETs por neutrófilos via TLR4 e que a formação dessas redes é dependente da geração de EROs e fosforilação de ERK e p38 MAPK. Considerando que uma produção excessiva de NETs contribui para a patologia de infecções virais respiratórias, propomos que o uso associado de DNase pode contribuir para a diminuição do dano inflamatório induzido na bronquiolite viral causada pela infecção por VSR. Assim caracterizamos o envolvimento das NETs por neutrófilos humanos durante a infecção pelo VSR.

4 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos envolvidos na formação de NETs induzida pela interação entre neutrófilos humanos e células epiteliais alveolares ou fibroblastos de pulmão infectados por VSR.

Objetivos Específicos

-Visualizar e determinar o tempo de formação de NETs em neutrófilos humanos infectados com diferentes concentrações de VSR;

-Caracterizar o papel de ROS e PAD4 para a formação de NETs induzida pelo VSR;

-Analisar a ativação da via das MAPK em neutrófilos infectados com VSR;

-Avaliar a possível participação das vias de sinalização da necroptose na indução de NETs;

-Avaliar o efeito da infecção de células epiteliais alveolares humanas (linhagem A549) ou fibroblastos pulmonares humanos (células não-tumorais MRC-5) por VSR ou UV-VSR sobre a produção de NETs por neutrófilos humanos.

5 HIPÓTESE

- Em um modelo murino de infecção pelo vírus Influenza H1N1, sugere-se que há formação de NETs ocluindo bronquíolos e em áreas de dano tecidual no pulmão;

- Em um modelo de asma induzida em camundongos, o rinovírus pode levar a formação de NETs no lavado bronqueoalveolar e sua patologia pode ser revertida com a utilização de DNase;

-Crianças infectadas por VSR também apresentam NETs no lavado bronqueoalveolar e em um modelo bovino de infecção por VSR observou-se a obstrução das vias aéreas pela formação de NETs;

-A proteína F do VSR liga ao receptor TLR-4, presente na superfície dos neutrófilos, levando à formação de NETs;

A hipótese deste projeto é que células epiteliais alveolares infectadas pelo VSR interagem diretamente com neutrófilos, ativando-os e induzindo a produção de NETs, as quais, em excesso podem piorar a patogênese da infecção.

6 METODOLOGIA

Reagentes

Diphenyleneiodonium (DPI), Apocynin (APO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), LY294002, carboxymethylcellulose sodium salt e dextran de *Leuconostoc* spp. foram obtidos da Sigma-Aldrich. Hoechst 33342, rabbit anti-Mouse IgG secondary antibody, HRP, goat anti-Mouse IgG1 secondary antibody, PE, Qubit dsDNA HS assay kit e 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) foram da Invitrogen. PD98059, SB203580 e Cl-Amidine forma da Cayman Chemical. Ham's F-12 Nutrient Mix, Opti-MEM, DMEM, RPMI 1640 e Soro Fetal Bovino (SFB) foram da Gibco. Anti-neutrophil elastase antibody foi da Abcam. Anti-RSV fusion protein antibody e Necrosulfonamide (NSA) foram da Millipore. Goat anti-rabbit IgG secondary antibody, Cy3 foi da Chemicon International. Mouse anti-human myeloperoxidase, PE (MPO) foi da BD Biosciences. O 7-Cl-O-Nec-1 (Nec-1s) foi doado pelo Dr. Ricardo Weinlich. Ficoll-Paque PLUS foi obtido da GE Healthcare. CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay foi da Promega. Falcon 8-well culture slides e transwell system foram da Corning. Chimeric (mouse/human) anti-TNF antibody Infliximab foi da Remicade; Centocor).

Amostra

Este estudo é de caráter experimental e foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (CEP/PUCRS) sob o número de protocolo CEP 1.743.173.

Neste estudo, foram coletados 20 mL de sangue total de doadores voluntários saudáveis (com idade média de 28 anos, de ambos os sexos). Todos os voluntários forneceram um consentimento livre e informado antes da coleta de sangue.

Cultivo viral

O vírus VSR A2 (doado gentilmente pelo Dr. Fernando Polack, Vanderbilt University School of Medicine, EUA) foi produzido em células VERO cultivadas em meio Opti-MEM com 2% de SFB a 37°C com 5% de CO₂. Para determinar o título viral, células VERO foram infectadas com VSR em meio sem soro seguido de um ensaio de placa com carboximetilcelulose. A titulação das placa de lise foi realizada usando um anticorpo anti-VSR e o título viral foi expresso em unidades formadoras de placa. As alíquotas virais foram armazenadas a -80°C.

Purificação e cultura de neutrófilos humanos

Sangue total (20 mL) foi coletado de doadores voluntários saudáveis em tubos tratados com heparina. Os neutrófilos foram isolados através de uma centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque. A seguir, os eritrócitos foram removidos por sedimentação utilizando dextran seguido de lise hipotônica. Os neutrófilos purificados foram ressuspensos em meio RPMI 1640 a 2×10^6 cells/mL. A viabilidade dos neutrófilos foi obtida através do ensaio de exclusão com azul de tripan e foi sempre superior a 98%.

Indução e quantificação de NETs

Os neutrófilos (2×10^6 células / mL) foram cultivados em RPMI 1640 e estimulados com PMA (50 nM) ou VSR A2 (10^2 - 10^6 PFU/mL) durante 10 ou 180 minutos a 37°C com 5% de CO₂.

Para avaliar o papel de vias de sinalização específicas para a liberação de NET durante a infecção com VSR, os neutrófilos foram pré-tratados durante 1 hora com os inibidores seletivos: Apocinina (APO; 10 µM), Diphenyleiodonium (DPI; 10 µM), LY294002 (LY; 50 µM;), PD98059 (PD; 30 µM), SB203580 (SB; 10 µM), Cl-Amidina (Cl-A; 12 µM), Necrosulfonamida (NSA; 5 µM) ou Necrostatina-1s (Nec-1s; 50 µM). Após o período de estimulação, o sobrenadante da cultura foi coletado e foi medido o DNA liberado extracelular utilizando o kit Quant-iT dsDNA HS e o fluorímetro Qubit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Imunofluorescência

Os neutrófilos (1×10^5 /300 µL) foram plaqueados em lâminas de cultura de 8 poços e incubados com VSR durante 180 minutos a 37°C com 5% de CO₂. As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) e foram marcadas ou com o anticorpo anti-RSV fusion protein (1:1000) seguido pelo anticorpo secundário anti-mouse PE (1:500), ou com o anticorpo anti-elastase (NE; 1:1000) seguido pelo anticorpo secundário anti-rabbit Cy3 (1:500) ou com o anticorpo anti-myeloperoxidase PE (MPO; 1:1000) e Hoechst 33342 (1:2000). As imagens foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 5.

Co-cultura de neutrófilos e células epiteliais (linhagem A549) ou fibroblastos pulmonares humanos (células não-tumorais MRC-5)

A linhagem celular epitelial de adenocarcinoma pulmonar (A549) e a linhagem celular de fibroblastos do pulmão humano não tumoral (MRC-5) foram cultivadas em monocamadas e mantidas em F-12 ou meio DMEM, respectivamente, suplementado

com 10% de SFB a 37°C com 5% de CO₂. As células A549 ou MRC-5 (1,5 x 10⁵ células/mL) foram infectadas com diferentes concentrações de VSR ativo ou inativado por UV (10² - 10⁴ PFU/mL) durante 48 horas a 37 ° C com 5% de CO₂. Após este período, o meio foi substituído, os neutrófilos humanos foram adicionados à cultura na razão de 1 célula epitelial ou fibroblasto para 5 neutrófilos e a co-cultura foi mantida durante 180 minutos a 37 ° C com 5% de CO₂. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados e o DNA extracelular foi medido usando o kit Quant-iT dsDNA HS, seguindo as instruções do fabricante.

Ensaio de citotoxicidade celular

A citotoxicidade celular foi avaliada através da detecção de LDH nos sobrenadantes de neutrófilos estimulados com VSR (10² - 10⁶ PFU/mL) durante 180 minutos utilizando o kit CytoTox de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram feitas no leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom) no comprimento de onda de 490 nm. O percentual de citotoxicidade foi calculado da seguinte forma:

Percentual de citotoxicidade (%)= (absorbância dos grupos experimentais / absorbância máxima obtida no controle positivo) x 100.

Ensaio de viabilidade celular

O teste de MTT foi realizado em células A549 infectadas com diferentes concentrações de VSR (10² - 10⁴ PFU/mL) durante 24, 48 e 72 horas. Resumidamente, adicionou-se a solução de MTT (40 µL, 5 mg/mL) à cultura, que foi mantida durante 4 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, a solução de MTT foi removida e DMSO (120 µL) foi adicionado às células. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom) com um comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi calculada da seguinte forma:

Viabilidade celular (%) = (média de absorbâncias dos grupos infectados / média de absorbâncias dos grupos controles) x 100.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados usando o pacote de software GraphPad Prism 5. As diferenças estatísticas entre múltiplos grupos foram analisadas com ANOVA unidirecional e teste pós-hoc de Tukey. As diferenças entre dois grupos foram analisadas com o teste t de *student*. Os dados foram apresentados como média ± DP e o nível de significância foi estabelecido em p≤0,05.

7 CONCLUSÃO

Essa dissertação apresentou um importante papel dos neutrófilos durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório que condiz com os estudos publicados envolvendo outros vírus respiratórios. A exacerbação da resposta imunológica ocorre quando a replicação viral é muito grande e há escape dos mecanismos de defesa. Sendo assim, conseguir visualizar todo o contexto com que ocorre a resposta imune auxilia quando não é mais possível utilizar um método preventivo de imunização ou não há ainda um medicamento específico para combater a infecção. Assim, as NETs se apresentam em dois contextos, um benéfico por auxiliar a combater o vírus e outro não benéfico ao hospedeiro que ocorre quando há oclusão das vias aéreas e dano tecidual sendo que esse efeito pode ser amenizado através da utilização de enzimas que quebram moléculas de DNA, tais como, a DNase. Aqui mostramos que os neutrófilos efetivamente produzem redes extracelulares quando cultivados com células epiteliais infectadas pelo VSR e quais os mecanismos de ativação desse mecanismo de defesa neutrofílica. Sugerindo assim que os neutrófilos podem contribuir agravando a patologia pulmonar em crianças com bronquiolite causada por VSR.

REFERÊNCIAS

- 1- Brealey J, Sly P, Young P, Chappell K. Viral bacterial co-infection of the respiratory tract during early childhood. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362(10).
- 2- Wright A, Taussig L, Ray C, Harrison H, Holberg C. The Tucson Children's Respiratory Study. *Am J Epidemiol.* 1989;129(6):1232-1246.
- 3- Edwards K, Zhu Y, Griffin M, Weinberg G, Hall C, Szilagyi P et al. Burden of Human Metapneumovirus Infection in Young Children. *N Engl J Med.* 2013;368(7):633-643.
- 4- Wollmeister E, Alvarez A, Bastos J, Marson F, Ribeiro J, Baracat E et al. Respiratory syncytial virus in Brazilian infants – Ten years, two cohorts. *J Clin Virol.* 2018;98:33-36.
- 5- Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Stat Q.* 1992;45(2-3):180-191.
- 6- Tregoning J, Schwarze J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):74-98.
- 7- Noah T, Becker S. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol.* 1993;265(5):L472-L478.
- 8- Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;18(2):115-122.
- 9- Smith P, Wang S, Dowling K, Forsyth K. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *J Paediatr Child Health.* 2001;37(2):146-151.
- 10-McNamara P. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch Dis Child.* 2003;88(10):922-926.
- 11-Bueno S, González P, Pacheco R, Leiva E, Cautivo K, Tobar H et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(10):1320-1329.
- 12-Lay M, González P, León M, Céspedes P, Bueno S, Riedel C et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes Infect.* 2013;15(3):230-242.

- 13-Abu-Harb M, Bell F, Finn A, Rao W, Nixon L, Shale D et al. IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. *Eur Respir J*. 1999;14(1):139.
- 14-Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017.
- 15-Yipp B, Kubes P. NETosis: how vital is it?. *Blood*. 2013;122(16):2784-2794.
- 16-Shi T, Balsells E, Wastnedge E, Singleton R, Rasmussen Z, Zar H et al. Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(2).
- 17-Kim H, Canchola J, Brandt C, Pyles G, Chanock R, Jensen K et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969;89(4):422-434.
- 18-Waris M, Tsou C, Erdman D, Zaki S, Anderson L. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol*. 1996;70(5):2852-2860.
- 19-Moghaddam A, Olszewska W, Wang B, Tregoning J, Helson R, Sattentau Q et al. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. *Nat Med*. 2006;12(8):905-907.
- 20-Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb R et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(12):2912-2913.
- 21-Hacking D, Hull J. Respiratory Syncytial Virus—Viral Biology and the Host Response. *J Infect*. 2002;45(1):18-24.
- 22-Ogra P. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5:S119-S126.
- 23-Shedden W, Emery J. Immunofluorescent evidence of respiratory syncytial virus infection in cases of giant-cell bronchiolitis in children. *J Pathol Bacteriol*. 1965;89(1):343-347.
- 24-Pickles R, DeVincenzo J. Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis. *J Pathol*. 2014;235(2):266-276.
- 25-Graham B, Anderson L. Challenges and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines. New York: Springer-Verlag Berlin An; 2013.

- 26-Zinserling A. Peculiarities of lesions in viral and mycoplasma infections of the respiratory tract. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat.* 1972;356(3):259-273.
- 27-Johnson J, Gonzales R, Olson S, Wright P, Graham B. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol.* 2006;20(1):108-119.
- 28-Spann K, Tran K, Collins P. Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF- κ B, and Proinflammatory Cytokines. *J Virol.* 2005;79(9):5353-5362.
- 29-Liu P, Jamaluddin M, Li K, Garofalo R, Casola A, Brasier A. Retinoic Acid-Inducible Gene I Mediates Early Antiviral Response and Toll-Like Receptor 3 Expression in Respiratory Syncytial Virus-Infected Airway Epithelial Cells. *J Virol.* 2006;81(3):1401-1411.
- 30-Kim T, Lee H. Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection. *BMB Rep.* 2014;47(4):184-191.
- 31-Chang J, Braciale T. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8⁺ T-cell effector activity and peripheral CD8⁺ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med.* 2002;8(1):54-60.
- 32-Ramaswamy M, Shi L, Monick M, Hunninghake G, Look D. Specific Inhibition of Type I Interferon Signal Transduction by Respiratory Syncytial Virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30(6):893-900.
- 33-Olson M, Hartwig S, Varga S. The Number of Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Specific Memory CD8 T Cells in the Lung Is Critical for Their Ability to Inhibit RSV Vaccine-Enhanced Pulmonary Eosinophilia. *J Immunol.* 2008;181(11):7958-7968.
- 34-Olson M, Varga S. Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7(8):1239-1255.
- 35-Swedan S, Andrews J, Majumdar T, Musiyenko A, Barik S. Multiple Functional Domains and Complexes of the Two Nonstructural Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus Contribute to Interferon Suppression and Cellular Location. *J Virol.* 2011;85(19):10090-10100.
- 36-Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535.
- 37-Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012;12(1):109-116.

- 38-Fuchs T, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-241.
- 39-Steinberg B, Grinstein S. Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Sci STKE.* 2007;2007(379):pe11-pe11.
- 40-Hakim A, Fuchs T, Martinez N, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 2010;7(2):75-77.
- 41-Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-213.
- 42-Rohrbach A, Slade D, Thompson P, Mowen K. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol.* 2012;3.
- 43-Wong S, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine A et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med.* 2015;21(7):815-819.
- 44-Mor-Vaknin N, Saha A, Legendre M, Carmona-Rivera C, Amin M, Rabquer B et al. DEK-targeting DNA aptamers as therapeutics for inflammatory arthritis. *Nat Commun.* 2017;8:14252.
- 45-Pilsczek F, Salina D, Poon K, Fahey C, Yipp B, Sibley C et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413-7425.
- 46-Yipp B, Petri B, Salina D, Jenne C, Scott B, Zbytniuk L et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386-1393.
- 47-Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon H. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-1444.
- 48-Clark S, Ma A, Tavener S, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly M et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-469.
- 49-Jorch S, Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 2017;23(3):279-287.

- 50-Urban C, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668-676.
- 51-Guimaraes-Costa A, Nascimento M, Froment G, Soares R, Morgado F, Conceicao-Silva F et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6748-6753.
- 52-Sørensen O, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1612-1620.
- 53-Narasaraju T, Yang E, Samy R, Ng H, Poh W, Liew A et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am J Pathol.* 2011;179(1):199-210.
- 54-Ashar H, Mueller N, Rudd J, Snider T, Achanta M, Prasanthi M et al. The Role of Extracellular Histones in Influenza Virus Pathogenesis. *Am J Pathol.* 2018;188(1):135-148.
- 55-Toussaint M, Jackson D, Swieboda D, Guedán A, Tsourouktsoglou T, Ching Y et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med.* 2017;23(6):681-691.
- 56-Funchal G, Jaeger N, Czepielewski R, Machado M, Muraro S, Stein R et al. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4–Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. *PLOS One.* 2015;10(4):e0124082.
- 57-Cortjens B, de Boer O, de Jong R, Antonis A, Sabogal Piñeros Y, Lutter R et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol.* 2015;238(3):401-411.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 Faculdade de Medicina / Hospital São Lucas da PUCRS
 Instituto de Pesquisas Biomédicas - IPB

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: Papel da interação entre neutrófilos e células epiteliais alveolares infectadas por VSR na formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs)

I. Justificativa e objetivos da pesquisa

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo para melhor avaliarmos a interação entre células epiteliais alveolares e neutrófilos, que são células do sistema imunológico, durante a infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR). O vírus sincicial respiratório (VSR) é a principal causa de infecções respiratórias em crianças menores de 2 anos de idade com alta prevalência e distribuição mundial sendo associado principalmente à bronquiolite. Este vírus pode causar infecção grave e não há tratamento ou vacina disponível. Este estudo que será realizado Instituto de Pesquisas Biomédicas no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul tem o objetivo de avaliar se neutrófilos, que são excessivamente recrutados durante a infecção pelo VSR, estão agravando o dano pulmonar durante a infecção.

II. Os procedimentos a serem utilizados

Se você concordar com sua participação no estudo, assinando este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, será realizada uma coleta de sangue periférico venoso, realizada por profissionais capacitados, com a duração de aproximadamente 15 minutos. Serão coletados 20 mL de sangue.

III. Desconfortos e Riscos

Como este estudo não envolve a pesquisa de nenhum medicamento, os riscos associados se restringem aos procedimentos a serem realizados no estudo, como a coleta de sangue. A coleta de sangue pode causar leve desconforto ou eventualmente hematoma na região onde o sangue será coletado, porém o desconforto cessa assim que a coleta termina e o hematoma desaparece em poucas semanas.

Você será informado caso algum novo risco ou desconforto seja identificado durante o estudo.

IV. Benefícios que se pode obter

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Responsável

Não há garantias de benefícios possíveis devido à sua participação neste estudo. A sua participação, juntamente com outras pessoas, contribuirá para a Ciência, conhecimentos sobre os quais podem levar ao desenvolvimento de uma vacina para o VSR.

V. Compensação pela participação

Você não receberá nenhum pagamento para participar do estudo. Não haverá custos para os participantes do estudo.

VI. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si

A sua participação neste estudo é voluntária. Você pode desistir da participação no estudo a qualquer momento sem sofrer conseqüências ou perda de seus direitos. Se você desistir de participar do estudo, os dados de pesquisa obtidos antes desta decisão ainda poderão ser utilizados dentro dos limites permitidos, mas nenhum dado novo será coletado posteriormente.

VII. Garantia de Privacidade

Os resultados são confidenciais e não poderão ser utilizados para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, mas a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo. O Comitê de Ética em Pesquisa ao qual o projeto foi submetido poderá ter acesso aos dados da pesquisa. O material biológico coletado no estudo não será armazenado.

VIII. Garantia de resposta a qualquer pergunta

Caso após a leitura do termo ainda restar alguma dúvida sobre este estudo, o senhor (a) poderá contatar o pesquisador responsável, Profa. Dra. Bárbara Nery Porto.

Dra. Bárbara N. Porto

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 Instituto de Pesquisas Biomédicas
 Av. Ipiranga, 6690/2º andar, sala 31 – Bairro Jardim Botânico
 Porto Alegre - RS
 CEP 90610-000
 Tel: (51) 3320-3000 ramal 3403 ou (51) 8183-9066

Se você tiver dúvidas sobre os seus direitos como sujeito de pesquisa, você poderá procurar:

Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS

Horário de Atendimento

De segunda a sexta-feira - Manhã: 8h30min às 12h

Tarde: 13h30min às 17h

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Responsável

Av. Ipiranga 6681, Prédio 50 - Sala 703 Porto Alegre/RS - Brasil

Fone/Fax: (51) 3320.3345

E-mail: cep@pucrs.br

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu,.....
concordo em
 participar do Projeto titulado: **“Papel da interação entre neutrófilos e células
 epiteliais alveolares infectadas por VSR na formação de redes extracelulares de
 neutrófilos (NETs)”** e fui informado sobre os reais objetivos da pesquisa de maneira
 clara e detalhada. Eu li e entendi o conteúdo deste documento. Tive oportunidade de
 discutir o estudo com o coordenador (ou alguém de sua equipe designado para este fim)
 e me sinto suficientemente familiarizado com o estudo para dar o meu consentimento
 voluntário para a participação neste estudo. Declaro ainda que sei que poderei entrar em
 contato com a equipe caso haja dúvidas. Além disso, sei que as informações dadas nesse
 estudo são confidenciais, e poderei me desligar do estudo a qualquer momento, apenas
 preciso informar os pesquisadores da minha decisão.

Declaro que recebi uma cópia do presente Termo de Consentimento e concordo com a
 minha participação neste estudo.

Nome

Assinatura.....

Contatos: () ().....

Data: ___/___/___

Nome do Pesquisador.....

Assinatura do Pesquisador.....

Data: ___/___/___

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Responsável

ANEXO A - APROVAÇÃO SIPESQ**SIPESQ**Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7515

Porto Alegre, 5 de agosto de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMEDICAS da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Papel da interação entre neutrófilos e células epiteliais alveolares infectadas por VSR na formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs)". Este projeto necessita da apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMEDICAS

ANEXO B - APROVAÇÃO CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PAPEL DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES INFECTADAS POR VSR NA FORMAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)

Pesquisador: Bárbara Nery Porto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59706816.3.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.743.173

Apresentação do Projeto:

PAPEL DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES INFECTADAS POR VSR NA FORMAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)

Pesquisador responsável: Bárbara Nery Porto

Instituição Responsável: PUCRS

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é avaliar os mecanismos envolvidos na formação de redes extracelulares de neutrófilos induzidas pela interação entre neutrófilos e células epiteliais alveolares ou fibroblastos pulmonares infectadas por VSR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos associados se restringem à coleta de sangue, que pode causar leve desconforto ou eventualmente hematoma na região onde o sangue será coletado, porém o desconforto cessa assim que a coleta termina e o hematoma desaparece em poucas semanas. O benefício ao participante voluntário é restrito à contribuição científica para o desenvolvimento de uma vacina

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucls.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS**



Continuação do Parecer: 1.743.173

para o VSR.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados e estão adequadamente redigidos e assinados.

Recomendações:

Retificar o endereço do CEP no TCLE que consta como apêndice no projeto de pesquisa.

TCLE: acrescentar a palavra "no" antes de Instituto de Pesquisas Biomédicas na sétima linha da justificativa e objetivos da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_788458.pdf	05/09/2016 17:29:56		Aceito
Outros	Documento_Unificado_SIPESQ1470398098151.pdf	05/09/2016 17:27:51	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_Aprovacao_Comissao_Cientifica_1470398098151.pdf	05/09/2016 17:26:58	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_PauloPitrez.pdf	05/09/2016 17:25:30	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_encaminhamentoCEP.pdf	05/09/2016 17:24:28	Bárbara Nery Porto	Aceito
Orçamento	Orcamento_projStefanie.docx	05/09/2016 17:23:53	Bárbara Nery Porto	Aceito
Orçamento	Orcamento_projStefanie.pdf	05/09/2016 17:23:34	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_versao_final.docx	05/09/2016 17:23:09	Bárbara Nery Porto	Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@puors.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.743.173

Ausência	TCLE_versao_final.docx	05/09/2016 17:23:09	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao_final.pdf	05/09/2016 17:22:46	Bárbara Nery Porto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CURRICULOS_LATTES_PESQUISADO RES.pdf	05/09/2016 17:20:51	Bárbara Nery Porto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_Stefanie.docx	05/09/2016 17:19:08	Bárbara Nery Porto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_Stefanie.pdf	05/09/2016 17:18:50	Bárbara Nery Porto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/09/2016 17:18:30	Bárbara Nery Porto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Setembro de 2016

Assinado por:
Denise Cantarelli Machado
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

ANEXO C - ARTIGO CIENTÍFICO

Revista: Scientific Reports

Respiratory Syncytial Virus induces the classical ROS-dependent NETosis through PAD-4 and necroptosis pathways activation

Stéfanie P. Muraro^{1,+}, Gabriela F. de Souza^{1,+}, Bruna K. da Silva², Marco Aurélio R. Vinolo², Elvira M. Saraiva³, and Bárbara N. Porto^{1,*}

¹Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Infant Center, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

²Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 13083-862, Brazil

³Laboratory of Immunobiology of Leishmaniasis, Department of Immunology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil

*barbara.porto@pucrs.br; bnporto@hotmail.com

+these authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of diseases of the respiratory tract in young children and babies, being mainly associated with bronchiolitis. RSV infection occurs primarily in pulmonary epithelial cells and, once infection is established, an immune response is triggered and neutrophils are recruited. In this study, we investigated the mechanisms underlying NET production induced by RSV. We show that RSV induced the classical ROS-dependent NETosis in human neutrophils and that RSV was trapped in DNA lattices coated with NE and MPO. NETosis induction by RSV was dependent on signaling by PI3K/AKT, ERK and p38 MAPK and required histone citrullination by PAD-4. In addition, RIPK1, RIPK3 and MLKL were essential to RSV-induced NETosis. MLKL was also necessary to neutrophil necrosis triggered by the virus, likely promoting membrane-disrupting pores, leading to neutrophil lysis and NET extrusion. Finally, we found that RSV infection of alveolar epithelial cells or lung fibroblasts triggers NET-DNA release by neutrophils, indicating that neutrophils can identify RSV-infected cells and respond to them by releasing NETs. The identification of the mechanisms responsible to mediate RSV-induced NETosis may prove valuable to the design of new therapeutic approaches to treat the inflammatory consequences of RSV bronchiolitis in young children.

Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV) is by far the most frequent cause of bronchiolitis and viral pneumonia in infants and young children worldwide^{1,2}. RSV infects virtually all children by the age of 3 years, but most severe infections occur in young infants between 2 and 4 months of age³. Despite being highly infective, RSV does not induce an efficient immunological memory, and children are repeatedly infected throughout life. Furthermore, it has been proposed that exposure to RSV infection early in life can lead to an increased susceptibility to suffer from recurrent allergic wheezing and asthma⁴.

RSV primarily infects respiratory epithelial cells and elicits an innate immune response characterized by the release of chemokines and cytokines that promote the recruitment of immune cells from the bloodstream to the infected tissue and the activation of resident cells⁵⁻¹⁰. Among neutrophil chemokines,

IL-8 has been shown to be released during infection, demonstrating a central role in the influx of neutrophils into the respiratory tract during RSV infection¹¹.

Neutrophils constitute a first line of defense against microbes and therefore are endowed with several antimicrobial mechanisms, such as phagocytosis, degranulation, and the generation of reactive oxygen species (ROS)¹². The most recently described mechanism is NETosis, which comprises the release to the extracellular milieu of DNA lattices, coated with granular and cytoplasmic proteins, the neutrophil extracellular traps (NETs)¹³. NET release is stimulated by a wide range of respiratory microorganisms, including viruses¹⁴⁻¹⁸.

The molecular mechanisms underlying NETosis are still poorly understood. The major route for NET release seems to be a slow lytic cell death process that occurs in time points beyond 1 hour of stimulation and is dependent on NADPH oxidase-derived ROS generation¹⁹. This ROS-dependent cell death program was named classical NETosis²⁰. However, an early/rapid NETosis, occurring in 5 – 30 minutes, which is ROS-independent, was also described²¹. The specific requirements for NET release depend on the stimulus, but histone deimination mediated by the enzyme peptidylarginine deiminase-4 (PAD-4) has been reported to be an essential step to NETosis^{22,23}. On the other hand, the participation of necroptosis signaling pathways, such as receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), RIPK3 and mixed lineage kinase domain-like pseudokinase (MLKL) has been controversial. GM-CSF in association with LPS or C5A has been shown to stimulate NET production independently of RIPK3 and MLKL signaling²⁴, while monosodium urate crystals and particles of different sizes and shapes may activate RIPK1-RIPK3-MLKL to induce NET release^{25,26}.

We have previously described that RSV virions and RSV fusion protein are both able to induce NET formation by human neutrophils¹⁷. Here we extend these findings by showing that RSV triggers the classical ROS-dependent NETosis. Moreover, NETs produced in response to RSV bound to virions, and expressed neutrophil elastase and myeloperoxidase in DNA threads. This mechanism is also dependent on PI3K/AKT, ERK, p38 MAPK and histone deimination by PAD-4. Surprisingly, RSV-induced NETosis relies on RIPK1-RIPK3-MLKL activation. However, only the necroptosis executioner protein, MLKL, is necessary for LDH release induced by RSV in neutrophils. Furthermore, RSV infection of alveolar epithelial cells or lung fibroblasts stimulates the release of NETs by human neutrophils, in a virus concentration-dependent manner. Interestingly, this effect is dependent on virus replication, since the infection of epithelial cells with UV-inactivated RSV does not induce NET release. The identification of these signaling mechanisms during RSV infection-triggered classical NETosis may lead to the development of novel therapies against RSV bronchiolitis pathogenesis.

Results

RSV induces the classical ROS-dependent NETosis in human neutrophils

We and others have previously demonstrated that RSV is able to stimulate the release of NETs from human and bovine neutrophils, respectively^{16,17}. However, the exact mechanisms underlying this phenomenon are not fully characterized. We sought to elucidate whether RSV would induce the early/rapid and/or classical NETosis, by stimulating human neutrophils for either 10 or 180 minutes. RSV was only able to stimulate NETs release after 180 minutes, in a concentration-dependent manner (**Figure 1A**). As a control, we stimulated neutrophils with PMA for the same time points. PMA also induced the classical NETosis, after 180 minutes of incubation (**Figure 1A**). It has been previously reported that ROS generation by NADPH oxidase complex is an essential process during the classical mechanism of NETosis^{19,27,28}. To evaluate the involvement of ROS on RSV-induced classical NETosis, human neutrophils were pretreated with two different NADPH oxidase inhibitors, apocynin (APO) and DPI. Pretreating neutrophils with APO abolished NET release elicited by RSV (**Figure 1B**). Similarly,

treatment with DPI profoundly inhibited RSV-stimulated classical NETosis (**Figure 1C**). Next, we performed confocal laser scanning microscopy to detect whether RSV was bound to the NETs. Consistently, our results revealed that NETs produced in response to RSV bound to the virions, as visualized by the co-localization of RSV F protein with extracellular DNA (**Figure 1D**). Additionally, RSV induced the release of NETs coated with the granular proteins NE (**Figure 1E**) and MPO (**Figure 1F**), as visualized by immunostaining. Together, these results indicate that RSV induces the classical ROS-dependent NET release, with DNA lattices expressing NE and MPO.

RSV promotes NET release dependently of PI3K/AKT, ERK and p38 MAPK activation

Previous studies have shown that AKT, ERK and p38 MAPK are important to direct neutrophils to NETosis²⁹⁻³¹. Thus, we decided to investigate the role of these proteins on NET production elicited by RSV, by treating neutrophils with selective inhibitors of PI3K/AKT, ERK and p38 MAPK. Pretreating the cells with PI3K/AKT inhibitor, LY294002, abrogated RSV-induced NET formation (**Figure 2A**). Treatment with PD98059, ERK inhibitor, as well as with SB203580, p38 MAPK inhibitor, significantly impaired NET release stimulated by the virus in human neutrophils (**Figure 2B and 2C**). These data suggest that NETosis induced by RSV occurs through a mechanism dependent on specific kinases activation.

Essential role for PAD-4 on classical NETosis induced by RSV infection

Histone citrullination by the enzyme peptidylarginine deiminase-4 (PAD-4) is necessary to chromatin decondensation and has been shown to be a central step to NET formation²³. Therefore, we sought to characterize the role of this enzyme during RSV-induced classical NETosis. Indeed, neutrophils treated with chloroamidine (PAD-4 inhibitor) failed to release NETs in response to RSV infection (**Figure 3**), indicating that PAD-4 plays an essential role on NET release promoted by RSV.

RIPK1, RIPK3 and MLKL are involved on RSV-driven NETosis

During classical NETosis, neutrophils are thought to enter a cell death process that culminates with the release of NETs, as the cell membrane breaks¹⁹. However, the participation of necroptosis signaling pathways during NETosis has been a matter of debate. GM-CSF in association with LPS or C5A has been shown to stimulate NET production independently of RIPK3 and MLKL signaling²⁴, while monosodium urate crystals and particles of different sizes and shapes may activate RIPK1-RIPK3-MLKL to induce NET release^{25,26}. To investigate the importance of necroptosis signaling pathways during RSV infection-induced NETosis, we incubated neutrophils with selective inhibitors of RIPK1, RIPK3 and MLKL proteins and infected them with RSV. Inhibiting RIPK1 kinase activity with NEC-1s completely suppressed NET production stimulated by RSV infection in human neutrophils (**Figure 4A**). Likewise, suppression of RIPK3 by GW42X and necrosulfonamide (NSA) inhibition of MLKL blocked RSV-induced NETosis (**Figure 4B and 4C**).

Next, we were interested in further elucidate the effect of RSV infection on neutrophil necrosis. We measured lactate dehydrogenase (LDH) activity as a marker of plasma membrane rupture in supernatants of neutrophils exposed to RSV. We stimulated neutrophils with increasing concentrations of RSV and measured LDH in supernatants. RSV-neutrophil interaction was able to induce the release of LDH in a concentration-dependent manner (**Figure 4D**). Surprisingly, pretreating neutrophils with NEC-1s did not affect LDH release induced by RSV (**Figure 4E**). On the other hand, the pretreatment of cells with NSA significantly reduced LDH release triggered by the virus (**Figure 4F**). Taken together, these data suggest that RIPK1 kinase activity mediates RSV-induced NETosis, but it is not necessary

for LDH release during RSV infection. The executioner protein of necroptosis, MLKL, is essential for both RSV-induced NETosis and LDH release.

RSV infection of alveolar epithelial cells and lung fibroblasts promotes NET release by human neutrophils

Since alveolar epithelial cells constitute the primary target for RSV infection^{32,33}, we decided to verify whether neutrophils would release NETs in response to RSV infection of A549 cell line. First, we evaluated the cytotoxic effect of virus on A549 cells by infecting them with increasing concentrations of RSV for different time points. A549 cells viability remained high (around 100%) until 48h of infection at all virus concentrations tested (10^2 , 10^3 and 10^4 PFU/mL). From 72h of infection, at 10^3 and 10^4 PFU/mL of RSV, cell viability significantly decreased to 75% and less than 50%, respectively (**Figure 5A**). Then, to ensure that 100% of alveolar epithelial cells would be alive during infection, in the subsequent experiments we exposed the cells to RSV for 48h. To analyze the effect of RSV infection of A549 cells on NET release by human neutrophils, A549 cells were infected for 48h, medium was replaced to remove free virus particles and neutrophils were only exposed to infected epithelial cells. Neutrophils were able to produce NETs in response to RSV infection of alveolar epithelial cells, in a virus concentration-dependent manner (**Figure 5B**). Interestingly, this effect was abolished when cells were stimulated with UV-inactivated RSV (UV-RSV) (**Figure 5C**), indicating that an active RSV infection of epithelial cells is necessary to induce NETosis. To rule out a possible effect of tumor cells on NET induction, we used MRC-5 cell line, a normal lung fibroblast line. RSV infection of lung fibroblasts was capable of inducing NETosis, in a virus concentration-dependent fashion (**Figure 5D**). Importantly, non-infected A549 or MRC-5 cells did not induce NET release from neutrophils (**Figure 5B and 5D**). Altogether, these data suggest that neutrophils are able to recognize alveolar epithelial cells and lung fibroblasts actively infected with RSV and to respond by releasing NETs.

Discussion

We describe here that increasing concentrations of RSV trigger NET release from human neutrophils after 180 minutes of stimulation. With the use of two different NADPH oxidase inhibitors, apocynin and diphenyleneiodonium, we show that RSV-induced NET release is dependent on NADPH oxidase-derived ROS generation. To date, two main mechanisms of NET formation have been proposed in the literature. The most studied route for NET production appears to be a slow lytic cell death mode, taking place in 180 – 240 minutes of stimulation, on which ROS produced by a functional NADPH oxidase are required¹⁹. In this process, neutrophils enter an irreversible cell death program that initiates with the loss of the characteristic lobular shape of the nucleus. At later time points, the nuclear envelope and the membranes of the granules dismantle, allowing the mixture of nuclear, cytosolic and granular components. After the chromatin and cell components are mixed, the plasma membrane breaks and NETs are extruded¹⁹. As the majority of NET-inducing stimuli relies on ROS production, this beneficial cell death mode was coined classical “NETosis”²⁰. However, in a NADPH oxidase-independent manner, neutrophils have been shown to extrude NETs after as little as 5 – 30 minutes in response to *Staphylococcus aureus*²¹, *Candida albicans*³⁴ and *Leishmania amazonensis*³⁵. Differently, this was not the case for RSV, which did not stimulate the early/rapid NETosis. One plausible explanation for such lack of effect is the time required for RSV infection of target cells, which starts in 2 – 3 hours after exposure³⁶.

It has been previously shown that NETs have the ability to capture viral particles, as is the case for HIV-1³⁷. Moreover, NETs have also been reported to attach to RSV particles¹⁶. However, in both of these studies, viruses were exposed to PMA-induced NETs. Using a more physiological approach, we stimulated neutrophils directly with RSV to visualize virions bound to the NETs. We demonstrate that

upon interaction with RSV, human neutrophils release NETs and that RSV virions were trapped by NET threads, as shown by the co-localization of RSV F protein with extracellular DNA. In addition, RSV triggered the formation of NETs decorated with proteins from the azurophilic granules, NE and MPO. These proteins have been shown to modulate NET release^{38,39} and to exert potent antimicrobial activities. MPO expressed on PMA-induced NETs was able to inactivate HIV-1³⁷. Nonetheless, whether MPO and NE present in RSV-induced NETs are able to inactivate the virus is yet to be elucidated.

It has been reported that AKT is essential to direct PMA-induced NADPH oxidase-dependent NETosis³¹. To address the importance of PI3K/AKT cascade on RSV-triggered NETosis, we incubated neutrophils with a PI3K inhibitor that leads to the dephosphorylation of AKT⁴⁰. Our results point out that the axis PI3K/AKT has a fundamental role on NETosis stimulated by RSV, since LY294002 abolished NET release induced by the virus. Similarly, recent evidence from the literature shows that different stimuli, such as monosodium urate crystals and viable opsonized *S. aureus*, promoted NETosis via PI3K activation⁴¹. Interestingly, upon the interaction with neutrophils, *Leishmania amazonensis* activated mainly the isoforms PI3K γ and PI3K δ to trigger NET production⁴². Besides PI3K/AKT, signaling activation by ERK and p38 MAPK downstream of NADPH oxidase has been shown to be necessary to NETosis^{29,30,43} and we have previously reported that RSV F protein induces the phosphorylation of ERK and p38 to stimulate NET formation¹⁷. In this sense, we demonstrate here that RSV-incited classical NETosis is mediated by the activation of ERK and p38 MAPK. More recently, AKT, ERK and p38 were shown to be major kinases responsible to regulate the transcription of genes involved in chromatin decondensation, necessary to PMA-driven NADPH oxidase-dependent NETosis⁴⁴. Thus, RSV might activate PI3K/AKT, ERK and p38 to control the transcription of specific genes during NETosis.

PAD-4-mediated conversion of arginine to citrulline in histones, also known as histone citrullination, is crucial to chromatin decondensation during NETosis^{22,23,45}. In fact, pharmacological inhibition of PAD-4 profoundly decreased chromatin decondensation and NET release in response to ionomycin, *Shigella flexneri* and *L. amazonensis*^{22,35}. Likewise, PAD-4-deficient neutrophils were shown to be unable to citrullinate histones, decondense chromatin and consequently, release NETs^{14,23}. Therefore, we investigated the participation of PAD-4 on RSV-triggered NET formation. Treatment of human neutrophils with chloroamidine abrogated the classical NETosis promoted by RSV. The requirement of PAD-4 for NET generation during RSV infection indicates that histone citrullination and chromatin decondensation must occur in order to neutrophils extrude NETs. Intriguingly, the infection of mice with Influenza A virus induces PAD-4-mediated NET formation in the inflamed lung, but these DNA lattices are not required for protection against the virus¹⁴. In addition to PAD-4, a functional NADPH oxidase activity has been shown to be required to chromatin decondensation that precedes NET release. The inability of neutrophils from CGD patients to produce NETs in response to PMA provides an indirect evidence of the essential role of NADPH oxidase for chromatin decondensation¹⁹. Nevertheless, the absence of chromatin decondensation when NADPH oxidase is inhibited by the use of DPI directly implies the activity of this enzyme on chromatin decondensation during NETosis⁴⁶. Hence, it is possible that PAD-4 and NADPH oxidase cooperate to promote histone citrullination and chromatin decondensation during RSV-induced NET formation, although a direct relationship between these enzymes remains elusive.

The final step of classical NETosis is the release of NETs via rupture of plasma membrane and cell lysis⁴⁷. Several studies have suggested that NETosis is a type of cell death program different from apoptosis and necrosis^{19,29,31,48}. Genetic analysis of neutrophils stimulated with PMA has shown that when NETosis is activated, there is a modulation of antiapoptotic proteins such as Mcl-1, blocking apoptosis²⁹. Furthermore, AKT has been reported to switch neutrophil death from apoptosis to NETosis by blocking caspases activation³¹. Taking into consideration that a ruptured plasma membrane is a feature of necrotic cell death and that RSV triggers the activation of a specific intracellular machinery to induce NETosis, we hypothesized that RSV could trigger NET release through the activation of signaling pathways involved in programmed necrosis, also called necroptosis. To test that, neutrophils were treated with specific inhibitors of RIPK1, RIPK3 and MLKL. Indeed, the pretreatment with NEC-

1s, a highly selective inhibitor of RIPK-1, completely suppressed NET release induced by RSV. Similarly, pretreating neutrophils with GW42X profoundly decreased NETosis and NSA inhibition of MLKL abolished NETosis promoted by the virus. Therefore, RSV activates the typical necroptosis signaling pathways preceding the release of NETs. Since classical NETosis occurs via cell lysis, we tested whether RSV would be able to induce LDH release as marker of plasma membrane rupture. In fact, RSV infection caused LDH release from neutrophils in a concentration-dependent fashion, confirming that this respiratory virus incites neutrophil necrosis. Interestingly, RIPK1 was not necessary to LDH release promoted by RSV, while the necroptosis executioner pseudokinase MLKL mediated RSV-induced LDH release from neutrophils. MLKL has been recognized as a key functional mediator of necroptosis⁴⁹. Once phosphorylated by RIPK3, MLKL translocates to the plasma membrane and forms membrane-disrupting pores, leading to cell lysis⁵⁰. The implication of necroptosis pathways during NETosis has been a matter of debate. It has been recently demonstrated that NET release occurs when gout-related monosodium urate crystals trigger human and mouse neutrophils to undergo RIPK1-RIPK3-MLKL-mediated necroptosis²⁵. Additionally, different microparticles have been reported to induce RIPK1-RIPK3-MLKL-dependent neutrophil necroptosis and that this mode of regulated cell death is associated with NETosis²⁶. Furthermore, vasculitis-associated antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) triggers NET release through the activation of necroptotic pathways, causing endothelial cell damage in vitro⁵¹. On the other hand, GM-CSF in association with LPS or C5A has been shown to stimulate NET formation independently of RIPK3 and MLKL signaling²⁴. Intriguingly, the signaling by RIPK3-MLKL has been shown to be both necessary and unnecessary to PMA-induced NET release by these two different groups^{24,25}. It is likely that distinct experimental conditions account for those discrepancies in the results. In our experimental settings, we used different inhibitors at the typical concentrations needed to block necroptosis and our data clearly indicates that RSV activates the necroptotic machinery (RIPK1-RIPK3-MLKL) to induce neutrophil lysis that precedes NET release.

Alveolar epithelial cells are the main targets of RSV infection, as well as the first site for the activation of an innate immune response¹⁰. In order to mimic a respiratory infection, we took advantage of a co-culture model, on which RSV-infected alveolar epithelial cells were exposed to naïve neutrophils. Our aim was to evaluate the effect of RSV infection of alveolar epithelial cells on NET release by human neutrophils. Indeed, neutrophils were able to recognize epithelial cells infected with RSV and to release NETs as a response to the epithelial infection. It is worth noting that free virus particles were removed from the culture system and neutrophils were only exposed to infected epithelial cells. Interestingly, an active RSV infection of alveolar epithelial cells is essential to NET generation, since stimulation of epithelial cells with UV-inactivated RSV was not able to trigger NET-DNA release. Thus, neutrophils identify alveolar epithelial cells actively infected with RSV and respond to infection by releasing NETs. We are currently investigating the mechanisms of neutrophil recognition of infected epithelial cells. To rule out a possible effect of tumor cells (A549 cells) on NET induction during RSV infection, we infected a normal lung fibroblast line and measured NET-DNA release. Our data show that RSV infection of lung fibroblasts was capable of inducing NETosis. NETs contain several antimicrobial molecules capable of damaging endothelial and epithelial cells, as is the case of histones⁵². Furthermore, NETs were also linked with potential lung damage during influenza and rhinovirus infection^{15,53}. In fact, patients with severe influenza A infection presented high levels of plasma NET-DNA, which were correlated with the severity of disease and a poor prognosis⁵⁴.

In conclusion, our study demonstrates that RSV infection triggers the classical ROS-dependent NETosis in human neutrophils. This induction needs additional signaling by PI3K/AKT, MAPK and requires histone citrullination by PAD-4. Importantly, we uncover that RSV-induced classical NETosis relies on the activation of the necroptotic machinery, namely RIPK1-RIPK3-MLKL proteins (**Figure 6**). Furthermore, neutrophils are able to identify RSV-infected alveolar epithelial cells and lung fibroblasts and to respond by releasing the cytotoxic DNA threads, or NETs. The identification of the signaling cascades responsible to mediate NETosis induced by RSV infection may prove valuable to the design

of new therapeutic approaches to treat the devastating inflammatory consequences of RSV bronchiolitis in young children.

Methods

Reagents. Diphenyleneiodonium (DPI), apocynin (APO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), LY294002, carboxymethylcellulose sodium salt and dextran from *Leuconostoc* spp. were purchased from Sigma-Aldrich. Hoechst 33342, rabbit anti-Mouse IgG secondary antibody, HRP, goat anti-Mouse IgG1 secondary antibody, PE, Qubit dsDNA HS assay kit and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) were from Invitrogen. PD98059, SB203580 and Cl-Amidine were from Cayman Chemical. Ham's F-12 nutrient mix, Opti-MEM, DMEM, RPMI 1640 and fetal bovine serum (FBS) were from Gibco. Anti-neutrophil elastase antibody was from Abcam. Anti-RSV fusion protein antibody and necrosulfonamide (NSA) were from Millipore. Goat anti-rabbit IgG secondary antibody, Cy3 was from Chemicon International. Mouse anti-human myeloperoxidase, PE (MPO) was from BD Biosciences. The 7-Cl-O-Nec-1 (Nec-1s) and GW42X were a gift from Dr. Ricardo Weinlich (Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil). Ficoll-Paque PLUS was from GE Healthcare. CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay was from Promega. Falcon 8-well culture slides and transwell system were from Corning. Chimeric (mouse/human) anti-TNF antibody infliximab was from Remicade; Centocor.

Virus Culture. The virus production of RSV A2 strain (kindly donated by Dr. Fernando Polack, Vanderbilt University School of Medicine, USA) was obtained in VERO cells cultured in Opti-MEM medium with 2% FBS at 37°C under 5% CO₂. To assess viral titer, VERO cells were infected with RSV in medium without serum followed by a carboxymethylcellulose plaque assay. Lysis plate titration was performed using an anti-RSV antibody and viral titer was expressed as plaque forming units (PFU). The virus aliquots were stored at -80°C.

Human Neutrophil Isolation. Whole blood (20 mL) was collected from healthy volunteer donors (with a mean age of 28 years, from both sexes) into heparin-treated tubes. Neutrophils were purified by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque. Erythrocytes were removed by dextran sedimentation followed by two rounds of hypotonic lysis. Purified neutrophils were re-suspended at 2×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium. Neutrophil viability was assessed by the trypan blue exclusion assay and was always higher than 98%.

Stimulation of neutrophils and quantification of NETs. Neutrophils (2×10^6 cells/mL) were stimulated with PMA (50 nM) or RSV A2 strain ($10^2 - 10^6$ PFU/mL) for either 10 or 180 minutes at 37°C under 5% CO₂. After the stimulation period, culture supernatant was collected and extracellular DNA was measured using the Quant-iT dsDNA HS kit and the Qubit fluorimeter (Invitrogen), following manufacturer's instructions. To evaluate the role of specific signaling pathways on RSV-induced NET release, neutrophils were pretreated for 1 hour with selective inhibitors: apocynin (APO; 10µM), diphenyleneiodonium (DPI; 10µM), LY294002 (LY; 50µM), PD98059 (PD; 30µM), SB203580 (SB; 10µM), Cl-Amidine (Cl-A; 12µM), necrostatin-1s (Nec-1s; 50 µM), GW42X (GW; 2 µM) or necrosulfonamide (NSA; 5µM). The Trypan Blue exclusion assay was used to evaluate the viability of cells treated with these inhibitors and at the end of incubation, cell viability was always higher than 97%. Due to the variability in the human donors' response, all data were presented as n fold negative control.

Immunofluorescence. Neutrophils ($1 \times 10^5/300$ µL) were seeded in 8-chamber culture slides and incubated with RSV for 180 minutes at 37°C under 5% CO₂. Cells fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) were stained with anti-RSV fusion protein (1:1000) followed by anti-mouse PE antibody (1:500),

anti-elastase (NE; 1:1000) followed by anti-rabbit Cy3 antibodies (1:500) or anti-myeloperoxidase PE antibody (MPO; 1:1000) and Hoechst 33342 (1:2000). Images were taken in a confocal Zeiss LSM 5 Exciter microscope.

A549 and MRC-5 cell culture and co-culture with neutrophils. Lung adenocarcinoma epithelial cell line (A549 cell) and non-tumor human lung fibroblast cell line (MRC-5 cell) were grown in monolayers and maintained in Ham's F-12 nutrient mix or DMEM medium, respectively, supplemented with 10% FBS at 37°C in 5% CO₂. A549 or MRC-5 cells (1.5 x 10⁵ cells/ mL) were infected with different concentrations of active or UV-inactivated RSV (10² – 10⁴ PFU /mL) in RPMI medium for 48 hours at 37°C in 5% CO₂. After this period, medium was replaced, human neutrophils were added to the cultures at the ratio of 1 epithelial cell/fibroblast: 5 neutrophils and the co-culture was maintained for 180 minutes at 37°C under 5% CO₂. Afterwards, the culture supernatants were collected and extracellular DNA was measured using the Quant-iT dsDNA HS kit, following manufacturer's instructions.

Cytotoxicity Measurements. Cellular cytotoxicity was assessed by detecting LDH in neutrophil supernatants stimulated with RSV (10² – 10⁶ PFU/mL) for 180 minutes using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit according to manufacturer's instructions. Readings were carried out at 490 nm wavelength, using EZ Read 400 microplate reader (Biochrom).

Cell Viability Assay. MTT assay was performed in A549 cells infected with different concentrations of RSV (10² – 10⁴ PFU/mL) for 24, 48 and 72 hours. Briefly, MTT solution (40 µL; 5 mg/mL) was added to the culture, which was maintained for 4 hours at 37°C in 5% CO₂. After this period, MTT solution was removed and DMSO (120 µL) was added to cells. Cell viability was assessed using EZ Read 400 microplate reader (Biochrom) at 570 nm wavelength.

Statistical Analyses. Data were presented as mean ± SD. The results obtained were analyzed using GraphPad Prism 5 statistical software package. Statistical differences among multiple groups were analyzed with one-way ANOVA with post-hoc Tukey test. Differences between two groups were analyzed with student's t-test. The level of significance was set at p≤0.05.

Ethics Statement. This study was carried out in accordance with the recommendations of the Research Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CEP/PUCRS). The protocol was approved by the Research Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CEP/PUCRS) under protocol number CEP 1.743.173. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

References

1. Johansson, C. Respiratory syncytial virus infection: an innate perspective. *F1000Res.* **5**, 2898 (2016).
2. Caballero, M. T., Polack, F. P. & Stein, R. T. Viral bronchiolitis in young infants: new perspectives for management and treatment. *J. Pediatr.* **93**, 75-83 (2017).
3. Acosta, P. L., Caballero, M. T. & Polack, F. P. Brief history and characterization of enhanced respiratory syncytial virus disease. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 189-195 (2015).
4. Harker, J. *et al.* Virally delivered cytokines alter the immune response to future lung infections. *J. Virol.* **81**, 13105-13111 (2007).
5. Noah, T. L. & Becker, S. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line. *Am. J. Physiol.* **265**, L472-L478 (1993).
6. Sheeran, P. *et al.* Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr. Infect. Dis.* **18**, 115-122 (1999).
7. Smith, P. K., Wang, S-Z., Dowling, K. D. & Forsyth, K. D. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *J. Paediatr. Child Health.* **37**, 146-151 (2001).

8. McNamara, P. S. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch. Dis. Child.* **88**, 922-926 (2003).
9. Bueno, S. M. *et al.* Host immunity during RSV pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1320-1329 (2008).
10. Lay, M. K. *et al.* Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes Infect.* **15**, 230-242 (2013).
11. Abu-Harb, M. *et al.* IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. *Eur. Respir. J.* **14**, 139 (1999).
12. Segal, A. W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 197-223 (2005).
13. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* **303**, 1532-1535 (2004).
14. Hemmers, S., Teijaro, J. R., Arandjelovic, S. & Mowen, K. A. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS ONE.* **6**, e22043 (2011).
15. Narasaraju, T. *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.* **179**, 199-210 (2011).
16. Cortjens, B. *et al.* Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J. Pathol.* **238**, 401-411 (2015).
17. Funchal, G. A. *et al.* Respiratory syncytial virus fusion protein promotes tlr-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLOS ONE.* **10**, e0124082 (2015).
18. Porto, B. N. & Stein, R. T. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: too much of a good thing?. *Front.Immunol.* **7**, 311 (2016).
19. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231-241 (2007).
20. Steinberg, B. E. & Grinstein, S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE.* **2007**, pe11-pe11 (2007).
21. Pilszczek, F. H. *et al.* A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **185**, 7413-7425 (2010).
22. Wang, Y. *et al.* Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Exp.Med.* **206**, i1-i1 (2009).
23. Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp.Med.* **207**, 1853-1862 (2010).
24. Amini, P. *et al.* NET formation can occur independently of RIPK3 and MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* **46**, 178-184 (2015).
25. Desai, J. *et al.* PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* **46**, 223-229 (2015).
26. Desai, J. *et al.* Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
27. Lim, M. B. H., Kuiper, J. W. P., Katchky, A., Goldberg, H. & Glogauer, M. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 771-776 (2011).
28. Kirchner, T. *et al.* The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm.* **2012**, 1-10 (2012).
29. Hakkim, A. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 75-77 (2010).
30. Keshari, R. S., Verma, A., Barthwal, M. K. & Dikshit, M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J. Cell. Biochem.* **114**, 532-540 (2013).
31. Douda, D. N., Yip, L., Khan, M. A., Grasemann, H. & Palaniyar, N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood.* **123**, 597-600 (2014).
32. Shedden, W. I. H. & Emery, J. L. Immunofluorescent evidence of respiratory syncytial virus infection in cases of giant-cell bronchiolitis in children. *J. Pathol. Bacteriol.* **89**, 343-347 (1965).
33. Aherne, W., Bird, T., Court, S. D. M., Gardner, P. S. & McQuillin, J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J. Clin. Pathol.* **23**, 7-18 (1970).

34. Byrd, A. S., O'Brien, X. M., Johnson, C. M., Lavigne, L. M. & Reichner, J. S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Immunol.* **190**, 4136-4148 (2013).
35. Rochael, N. C. *et al.* Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by Leishmania parasites. *Sci. Rep.* **5**, 18302 (2015).
36. Krzyzaniak, M. A., Zumstein, M. T., Gerez, J. A., Picotti, P. & Helenius, A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog.* **9**, e1003309 (2013).
37. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* **12**, 109-116 (2012).
38. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**, 677-691 (2010).
39. Metzler, K. D. *et al.* Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* **117**, 953-959 (2010).
40. Bondar, V. M., Sweeney-Gotsch, B., Andreeff, M., Mills, G. B. & McConkey, D. J. Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 989-997 (2002).
41. van der Linden, M., Westerlaken, G. H. A., van der Vlist, M., van Montfrans, J. & Meyaard, L. Differential signalling and kinetics of neutrophil extracellular trap release revealed by quantitative live imaging. *Sci. Rep.* **7**, 6529 (2017).
42. DeSouza-Vieira, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺]. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 801-810 (2016).
43. Muñoz-Caro, T. *et al.* Eimeria bovis-triggered neutrophil extracellular trap formation is CD11b-, ERK 1/2-, p38 MAP kinase- and SOCE-dependent. *Vet. Res.* **46**, 23 (2015).
44. Khan, M. A. & Palaniyar, N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci. Rep.* **7**, 41749 (2017).
45. Neeli, I., Khan, S. N. & Radic, M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol.* **180**, 1895-1902 (2008).
46. Remijsen, Q. *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* **21**, 290-304 (2010).
47. Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it?. *Blood.* **122**, 2784-2794 (2013).
48. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 134-147 (2017).
49. Zhang, J., Yang, Y., He, W. & Sun, L. Necrosome core machinery: MLKL. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2153-2163 (2016).
50. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C. & Han, J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* **28**, 9-21 (2018).
51. Schreiber, A. *et al.* Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E9618-E9625 (2017).
52. Saffarzadeh, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE.* **7**, e32366 (2012).
53. Toussaint, M. *et al.* Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat. Med.* **23**, 681-691 (2017).
54. Zhu, L. *et al.* High level of neutrophil extracellular traps correlates with poor prognosis of severe influenza A infection. *J. Infect. Dis.* **217**, 428-437 (2018).

Acknowledgements

The authors thank Dr. Ricardo Weinlich for kindly providing reagents; Ricardo Breda for technical assistance with confocal microscopy; Talita Baptista, Rachel Molina, Rafaela Radomski and Deise Nascimento de Freitas for the lab assistance. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant nr. 456282/2014-9 (to BP). SM was supported

by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship and GS was supported by CNPq fellowship.

Author contributions statement

B.P. and S.M. conceived this study. S.M., G.S. and B.S. performed experiments. B.P., S.M. and G.S. performed the statistical analysis. B.P., S.M., M.V. and E.S. interpreted the data and contributed reagents. B.P., S.M., G.S. wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript revision and approved the submitted version.

Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Legends

Figure 1. RSV induces the classical ROS-dependent NETosis in human neutrophils. (A) Human neutrophils ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were stimulated with RSV ($10^2 - 10^6$ PFU/mL), PMA (100nM) or left unstimulated for either 10 or 180 min. Neutrophils were pre-treated for 1 h with: (B) apocynin (APO) or (C) diphenyleneiodonium (DPI). Afterwards, cells were stimulated with RSV (10^4 PFU/mL) for 180 min. NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA HS kit (Invitrogen). Data are representative of 3 independent experiments performed in triplicates and represent mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ when compared to non-infected control (-); + $p < 0.05$ and ++++ $p < 0.0001$ when compared to RSV-stimulated neutrophils. (D-F) Neutrophils ($1 \times 10^5/300 \mu\text{L}$) were stimulated with RSV (10^4 PFU/mL) for 180 min at 37°C with 5% CO_2 in 8-chamber culture slides. Cells were fixed with 4% PFA and stained with (D) Hoechst 33342 (1:2000), anti-RSV fusion protein (1:1000) followed by anti-mouse PE antibody (1:500); (E) Hoechst 33342, anti-elastase (NE; 1:1000) followed by anti-rabbit Cy3 antibody (1:500); (F) Hoechst 33342 (1:2000), anti-myeloperoxidase PE (MPO, 1:1000) antibody. Overlay of the fluorescence images are shown in the last panels. Arrowheads indicate the presence of extracellular DNA lattices co-localized with RSV F protein, NE and MPO, respectively. NETs were magnified four times and are numbered (1, 2 and 3) on the right side. Images are representative of 3 independent experiments. Images were taken in a Zeiss LSM 5 Exciter microscope. Scale bars = 5 μm .

Figure 2. RSV promotes NET release dependently of PI3K/AKT, ERK and p38 MAPK activation. Human neutrophils ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were pre-treated for 1 h with: (A) LY294002 (50mM), (B) PD98059 (30mM) or (C) SB203580 (10mM) and stimulated with RSV (10^4 PFU/mL) for 180 min. Afterwards, NETs were quantified in culture supernatants, using Quant-iT dsDNA HS kit. Data are representative of at least 3 independent experiments performed in triplicates and represent mean \pm SD. **** $p < 0.0001$ when compared to non-infected control (-); ++++ $p < 0.0001$ when compared to RSV-infected neutrophils.

Figure 3. Essential role for PAD-4 on classical NETosis induced by RSV infection. Human neutrophils ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were pre-treated for 1 h with Cl-amidine (Cl-A, $12 \mu\text{M}$) and then stimulated with RSV (10^4 PFU/mL) for 180 min. Afterwards, NETs were quantified in culture supernatants, using Quant-iT dsDNA HS kit (Invitrogen). Data are representative of 2 independent experiments performed in triplicates and represent mean \pm SD. ** $p < 0.01$ when compared to non-infected control (-); +++ $p < 0.001$ when compared to RSV-infected neutrophils.

Figure 4. RIPK1, RIPK3 and MLKL are involved on RSV-driven NETosis. Neutrophils were pretreated with: (A) necrostatin-1s (Nec-1s; $50 \mu\text{M}$), (B) GW42X (GW; $2 \mu\text{M}$) or (C) necrosulfonamide (NSA; $5 \mu\text{M}$) for 1 h and stimulated with RSV (10^4 PFU/mL) for 180 min. After this period, NETs were quantified in culture supernatant, using Quant-iT dsDNA HS kit. (D) Supernatants from neutrophils stimulated with RSV ($10^2 - 10^6$ PFU/mL) for 180 minutes were collected and assayed for LDH release. (E,F) Supernatants from neutrophils pretreated for 1 h with Nec-1s ($50 \mu\text{M}$) or NSA ($5 \mu\text{M}$) and stimulated with RSV (10^4 PFU/mL) for 180 minutes were collected and assayed for LDH release. Cytotoxicity was measured at 490 nm. Data are representative of at least 2 independent experiments performed in triplicates and represent mean \pm SD. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ when compared to non-infected control (-); + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ when compared to RSV-stimulated neutrophils.

Figure 5. RSV infection of alveolar epithelial cells and lung fibroblasts promotes NET release by human neutrophils. (A) A549 cells ($1 \times 10^5/\text{mL}$) were infected with RSV ($10^2 - 10^4$ PFU/mL) for 24,

48 and 72 hours at 37°C under 5% CO₂ for cell viability assay with MTT. Cell viability was measured at 490 nm. **(B)** A549 cells (1 X 10⁵/mL) were infected with RSV (10² – 10⁴ PFU/mL) for 2 h at 37°C with 5% CO₂. Afterwards, medium was replaced and infected cells were incubated for 48 h at 37°C with 5% CO₂. After this period, the medium was replaced again and neutrophils (5 neutrophils : 1 epithelial cell ratio) were added to the culture. The co-culture was maintained for 150 min at 37°C under 5% CO₂. **(C)** A549 cells (1 X 10⁵/mL) were infected with active RSV (10⁴ PFU/mL) or UV-inactivated RSV (10⁴ PFU/mL) for 2 h at 37°C with 5% CO₂. Afterwards, medium was replaced and infected cells were incubated for 48 h at 37°C with 5% CO₂. After this period, the medium was replaced again and neutrophils (5 neutrophils : 1 epithelial cell ratio) were added to the culture. The co-culture was maintained for 150 min at 37°C under 5% CO₂. **(D)** MRC5 cells (5 X 10⁴/mL) were infected with RSV (10² – 10⁴ PFU/mL) for 2 h at 37°C with 5% CO₂. Afterwards, medium was replaced and infected cells were incubated for 48 h at 37°C with 5% CO₂. After this period, the medium was replaced again and neutrophils (5 neutrophils : 1 fibroblast ratio) were added to the culture. The co-culture was maintained for 150 min at 37°C under 5% CO₂. NETs were quantified in culture supernatants, using Quant-iT dsDNA HS kit. Data are representative of at least 3 independent experiments performed in triplicates and represent mean ± SD. ***p<0.001, ****p<0.0001 when compared to each respective non-infected cell control (A); **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 when compared to non-infected A549/MRC5 + Neut (B,C,D); ++++p<0.0001 when compared to RSV-infected A549 + Neut (C). Neut = Neutrophils.

Figure 6. Overview of RSV-triggered classical ROS-dependent NETosis in human neutrophils. RSV infection of human neutrophils leads to ROS generation via NADPH oxidase, which is necessary to NET formation. Additional signaling by PI3K/AKT, ERK and p38 MAPK is required. RSV-induced NETosis requires chromatin decondensation mediated by the enzyme PAD-4. Interestingly, RIPK1-RIPK3-MLKL are key proteins involved in necroptosis, but also essential to RSV-induced NETosis. The activation of these signaling pathways by RSV leads to plasma membrane rupture with the consequent release of decondensed chromatin fibers decorated with NE and MPO, characterizing NETs.

Figure 1

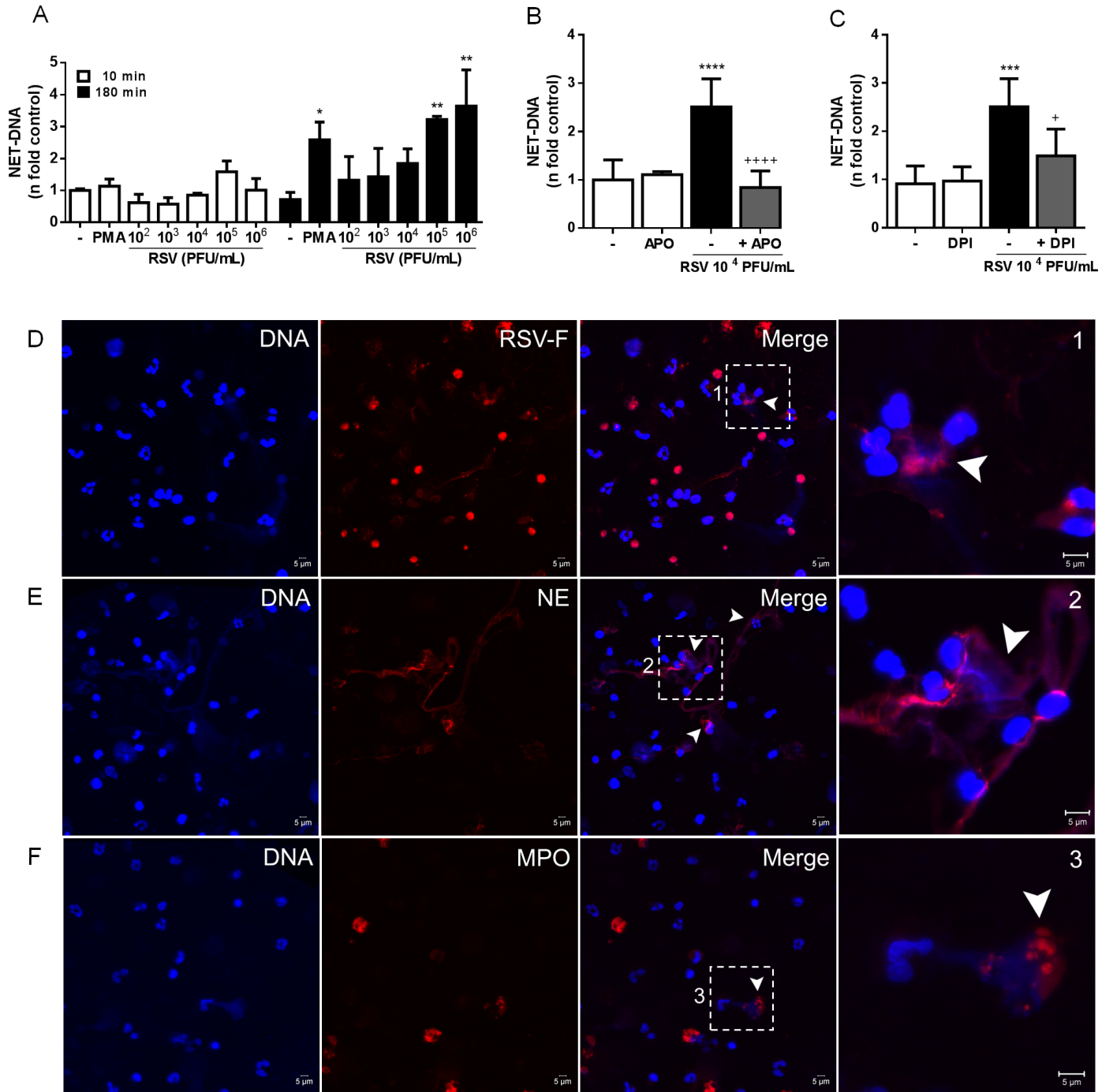


Figure 2

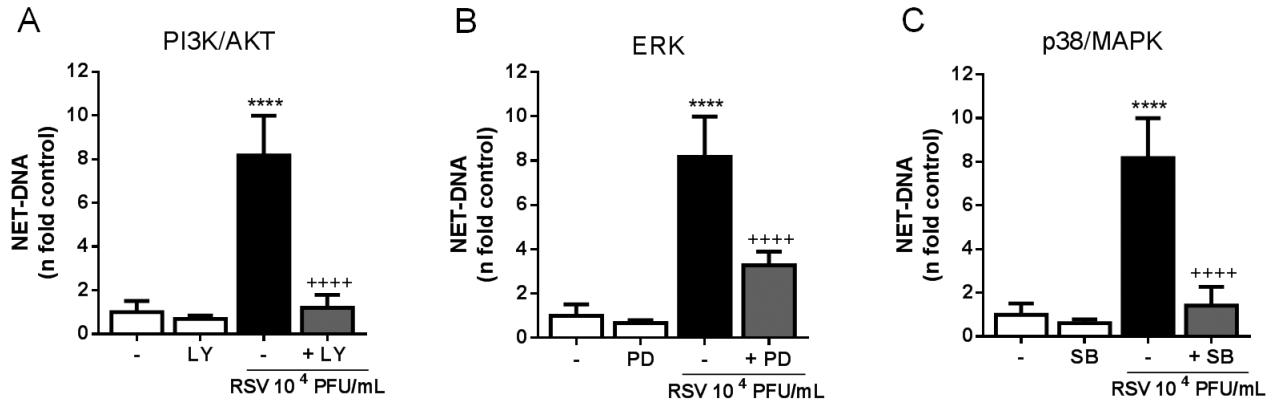


Figure 3

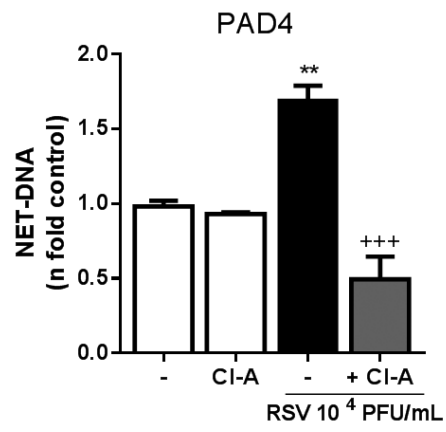


Figure 4

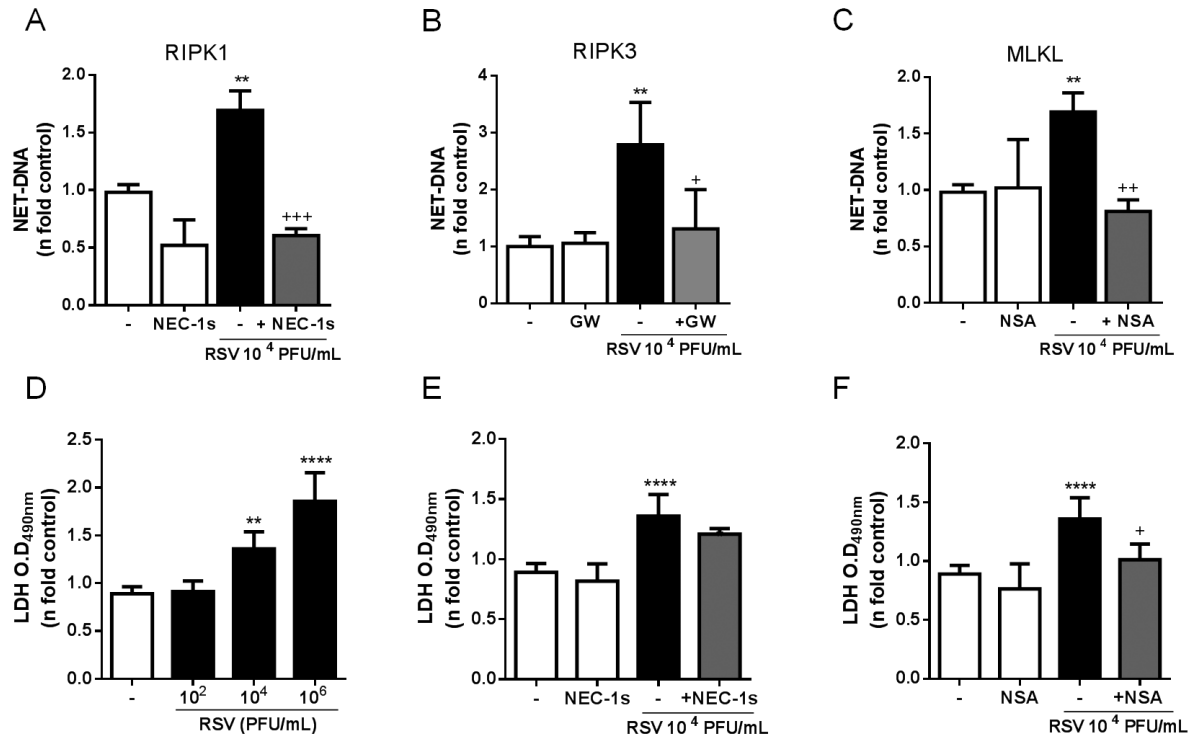


Figure 5

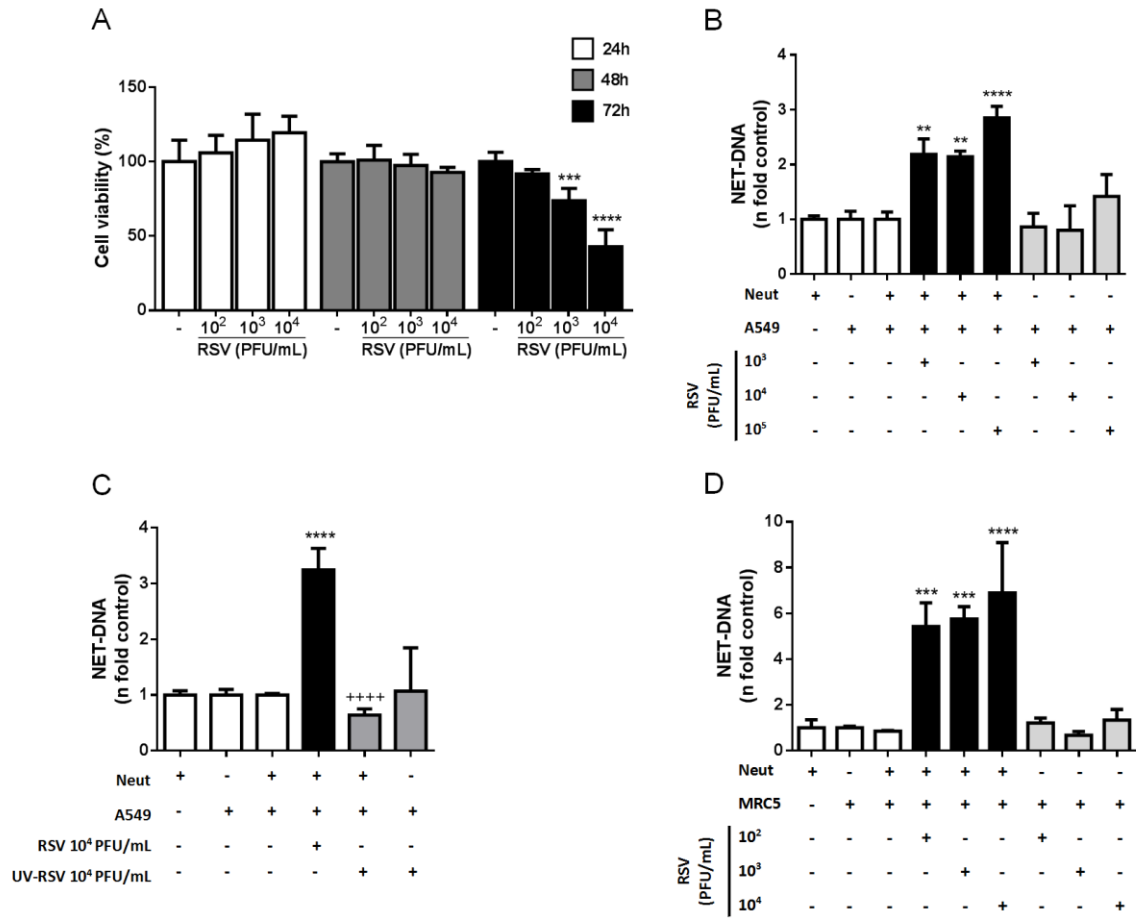
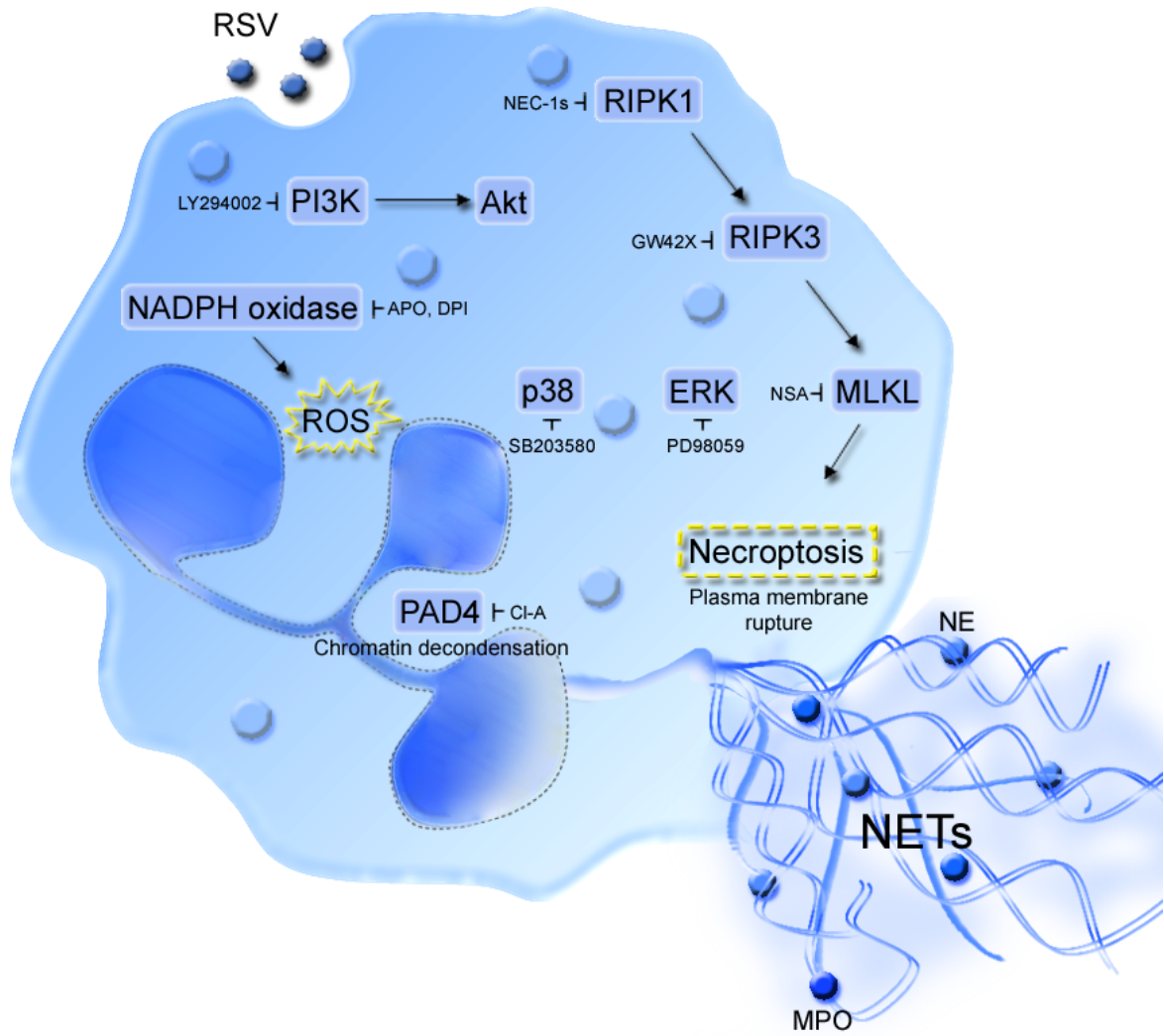


Figure 6





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br