



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GISELLE AFONSO FUNCHAL

**O PAPEL DA PROTEÍNA DE FUSÃO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
SOBRE A GERAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)**

Porto Alegre

2014

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUCRS
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**O PAPEL DA PROTEÍNA DE FUSÃO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
SOBRE A GERAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul
como requisito para obtenção do título de
mestre.

GISELLE AFONSO FUNCHAL

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Cristina Bonorino

Co-Orientadora:

Prof^a Dr^a. Bárbara Nery Porto

PORTO ALEGRE

2014

“Fico sozinho com o universo inteiro.
Não quero ir à janela:
Se eu olhar, que de estrelas!
Que grandes silêncios maiores há no alto!
Que céu anticitadino! —
Antes, recluso,
Num desejo de não ser recluso,
Escuto ansiosamente os ruídos da rua...
Um automóvel — demasiado rápido! —
Os duplos passos em conversa falam-me...
O som de um portão que se fecha brusco dói-me...
Vai tudo dormir...
Só eu velo, sonolentemente escutando,
Esperando
Qualquer coisa antes que durma...
Qualquer coisa.”
(Poema “Começa a Haver” de Álvaro de Campos)

Dedico esta minha dissertação ao meu irmão, que sempre esteve ao meu lado mesmo vários km distante, aos meus pais, por todo o apoio que sempre deram aos meus estudos, ao meu namorado, por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos, e a Aline, porque muito do que sou hoje deve-se à ela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo meu coração à Aline Bueno, Gabriela Vera, Anike Wilkens, Shenna Cardoso e Silvana Gonçalves, eu não teria conseguido sem vocês que hoje são minha família. Registro aqui a importância que cada uma de vocês teve no meu caminho até aqui.

Jonathan Spinelli, obrigada pela força que nunca faltou do teu lado. Obrigada por aturar todos os altos e baixos do meu mestrado, e continuar me apoiando, acreditando em mim e sonhando comigo. Obrigada por esta visão da ciência que compartilhamos e que parece tão difícil de encontrar. E obrigada pela tua música, que embalou e motivou minhas horas de estudo. Tudo toma cor ao lado das tuas notas, absolutamente tudo.

Obrigada Claudia Funchal, pelas horas ouvindo minhas lamúrias científicas e pessoais. Por tua paciência, por tu acreditar em meu potencial e por tua sinceridade sempre. Tu é muito especial pra mim.

Sou grata à todo o pessoal do laboratório, e principalmente à Stéfanie Muraro, que tornou-se minha amiga e confidente, e a Mileni Machado, pela parceria, risadas e compartilhamento de angústias, a Karen Magnus, pelas piadas, brincadeiras e apoio moral e a Elisa Simon, pela parceria e confiança. Agradeço também a minhas orientadoras, Cristina Bonorino e Bárbara Porto pela oportunidade e suporte. Bárbara, agradeço pela tua paciência e pelo apoio nessa caminhada.

Obrigada à todos que de alguma forma me deram força e me ajudaram durante meu mestrado, seja dentro dos laboratórios ou fora deles, principalmente àqueles que de alguma forma arrancaram um sorriso meu nestes 2 anos. E agradeço à CAPES pela bolsa taxas que me proporcionou estudar no PPGBCM da PUCRS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CID	Classificação Internacional de Doenças
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
ERKs	<i>Extracellular-signal-regulated Kinases</i>
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo 1
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ITRI	Infecções do Trato Respiratório Inferior
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
MPO	Mieloperoxidase
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NETS	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
RSV	Human Respiratory Syncytial Virus (Vírus Sincicial Respiratório Humano)

RESUMO

A bronquiolite viral aguda é a doença respiratória mais frequente em crianças nos primeiros anos de vida, sendo que ao menos a metade dos pacientes é diagnosticado com infecção respiratória por vírus como o Vírus Sincicial Respiratório (RSV). Por ser uma doença extremamente comum gera grande número de internações e grandes custos aos sistemas de saúde. A proteína de fusão (F) do RSV é essencial para o ciclo infectivo do vírus. Neutrófilos e seus produtos estão presentes nas vias aéreas de pacientes infectados por RSV que desenvolveram doença pulmonar aumentada devido a infecção viral. As Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) são formadas pela liberação do conteúdo nuclear dos neutrófilos no espaço extracelular em resposta a diferentes estímulos, sejam patogênicos ou não. Elas são fundamentais para impedir a disseminação de microrganismos, que são mortos pelas proteínas antimicrobianas que ficam ancoradas nas redes de DNA, como elastase e mieloperoxidase. O objetivo desta dissertação é caracterizar o efeito da proteína F do RSV sobre a geração de NETs. A proteína F foi capaz de induzir a formação de NETs *in vitro* de forma dose-dependente e com a co-expressão de elastase neutrofílica e mieloperoxidase. A produção de NETs pela proteína F foi mediada pelo TLR-4, e dependente da produção de ROS e de ERK-p38 MAPK. Juntos, estes dados fornecem evidências que suportam a ativação de vias de sinalização específicas pela proteína F para induzir a produção de NETs. A produção excessiva de NETs pode agravar os sintomas inflamatórios induzidos pela infecção com RSV.

Palavras-Chave: Vírus Sincicial Respiratório, Proteína de Fusão, Redes Extracelulares de Neutrófilos, TLR-4.

ABSTRACT

Acute viral bronchiolitis is the most common respiratory illness in children in the first years of life and at least half of patients are diagnosed with respiratory tract infection by viruses such as Respiratory Syncytial Virus (RSV). Because RSV is extremely common disease it generates large number of hospitalizations and large costs to health systems. The RSV Fusion (F) Protein is essential for the infective cycle of the virus. Neutrophils and their products are present in the airways of RSV-infected patients who developed increased lung disease due to viral infection. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) are formed by the release of the inner content of neutrophils (proteins from granules and DNA) in the extracellular space in response to different stimuli. They are essential to prevent the spread of microorganisms, which are killed by antimicrobial proteins that are anchored in networks of DNA, such as elastase and myeloperoxidase. The objective of this work is to characterize the effect of the RSV F protein on the generation of NETs. The F protein was capable of inducing the formation of NETs *in vitro* in a dose-dependent way with co-expression of neutrophil elastase and myeloperoxidase. The production of NETs in response to F protein was mediated by the TLR-4-receptor and was dependent on ROS production, p38 and ERK MAPK. Together, these data provide evidence that support the activation of specific signaling pathways by the F protein to induce the production of NETs. Excessive production of NETs can aggravate the inflammatory symptoms induced by infection with RSV.

Keywords: Respiratory Syncytial Virus, Fusion Protein, Neutrophil Extracellular Traps, TLR-4.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Família Paramyxoviridae a qual o RSV pertence.	15
Figura 2 - Esquema básico das etapas da formação das NETs	21
Figura 3 – Processo de formação das NETs dependente de NADPH oxidase	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Dados de Mortalidade no Brasil 2007-2010 em crianças menores de 1 ano de idade com CID-10 categoria J21 correspondente à Bronquiolite Aguda 14

Quadro 2 -Dados de Mortalidade no Brasil 2007-2010 em crianças com idade entre 1 ano à 4 anos com CID-10 categoria J21 correspondente à Bronquiolite Aguda..... 15

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO DO TEMA	13
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO E A BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA	13
1.2 O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV)	15
1.3 A INFECCÃO POR RSV E A RESPOSTA IMUNE INATA	16
1.4 NEUTRÓFILOS E RESPOSTA ANTIVIRAL: DOS MECANISMOS CLÁSSICOS ÀS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS	18
1.5 A FORMAÇÃO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS	21
2 HIPÓTESE.....	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL:	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	25
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	26
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
4 REFERÊNCIAS	63
ANEXO A – DEMAIS PRODUÇÕES DO MESTRADO	69
ANEXO B	72

Capítulo 1 – Apresentação do Tema

1 Introdução

1.1 A Epidemiologia do Vírus Sincicial Respiratório e a Bronquiolite Viral

Aguda

As infecções respiratórias agudas têm sido a principal causa de morte em crianças com idade inferior a cinco anos, sendo responsáveis por 4,5 milhões de óbitos a cada ano, a maioria destes ocorrendo em países em desenvolvimento (1). Bronquiolite aguda causada por vírus respiratórios é a doença prevalente em crianças nos dois primeiros anos de vida, com grande impacto em hospitalizações e custos para o sistema de saúde. Aproximadamente 30 em cada 1000 crianças hospitalizam por bronquiolites em todo o mundo (2). Vinte por cento de todas as crianças apresentam ao menos um episódio de sibilância no primeiro ano de vida, sendo que a maioria é diagnosticada com infecção por vírus.

A infecção por RSV (do inglês *Respiratory Syncytial Virus*, ou, Vírus Sincicial Respiratório) é a principal causa da bronquiolite viral e da pneumonia em todo o mundo, infectando acima de 50% das crianças nos primeiros anos de vida e cerca de 100% das crianças de até três anos de idade (3). Este vírus foi identificado e descrito pela primeira vez em 1956, e atualmente é considerado a principal causa isolada de infecção respiratória na infância (4,5).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram a cada ano, em todo o mundo, 4 milhões de mortes de crianças abaixo dos 5 anos de idade por infecção respiratória causada por RSV (6). Devido à prevalência do RSV, quase todas as crianças já foram infectadas pelo vírus ao alcançarem os dois anos de idade. Os maiores índices de infecção ocorrem no terceiro e quarto meses de vida.

O RSV não provoca uma resposta imune duradoura e por isso é comum a reinfeção (7,8,9). A maior parte das crianças abaixo dos 2 anos infectadas pelo RSV apresenta doença leve do trato respiratório superior; entretanto, algumas crianças estão sujeitas ao risco de

infecção grave do trato respiratório inferior (ITRI), que exige hospitalização, oxigenoterapia, ventilação mecânica e pode levar à morte (6).

Dados epidemiológicos de países em desenvolvimento mostram que o RSV é uma importante causa de ITRI em crianças, responsável por aproximadamente 70% de todos os casos. Provavelmente devido à presença de fatores agravantes, como superpopulação, poluição e desnutrição, a taxa de mortalidade após ITRI por RSV pode chegar a 7% nas crianças com menos de 2 anos de idade. Essa taxa é consideravelmente maior que a dos países desenvolvidos (0,5 – 2,0%), o que torna essa infecção viral um importante problema de saúde pública nessas regiões (6,10).

No Brasil não há dados epidemiológicos específicos para infecções com RSV, mas alguns estudos do DATASUS de 2007 a 2010 (11) conforme demonstrado nos quadros 1 e 2, que mensuraram óbitos por bronquiolite aguda (a principal manifestação clínica da doença), indicam que a taxa de mortalidade infantil de crianças com menos de 1 ano de vida com bronquiolite viral aguda é superior à taxa de mortalidade de crianças de 1 a 4 anos com bronquiolite viral aguda no Brasil. Publicações brasileiras tem apontado a prevalência da infecção viral por RSV em crianças com infecção respiratória aguda (12) e apontam uma sazonalidade deste vírus em apenas algumas regiões no Brasil, como Recife (12) e São Paulo (13,14), carecendo-se de maiores dados epidemiológicos específicos para infecções causadas por RSV no país em outros estados.

Quadro 1 – Dados de Mortalidade no Brasil 2007-2010 em crianças menores de 1 ano de idade com CID-10 categoria J21 correspondente à Bronquiolite Aguda

DATASUS: Mortalidade - Brasil					
Óbitos p/Residência por Ano do Óbito segundo Categoria CID-10					
Categoria CID-10: J21 Bronquiolite aguda					
Faixa Etária: <u>Menor 1 ano</u>					
Período: 2007-2010					
	Categoria CID-10	2007	2008	2009	2010
	TOTAL	179	182	197	168
	J21 Bronquiolite aguda	179	182	197	168

Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM
Modificada

Quadro 2 -Dados de Mortalidade no Brasil 2007-2010 em crianças com idade entre 1 ano à 4 anos com CID-10 categoria J21 correspondente à Bronquiolite Aguda

DATASUS: Mortalidade - Brasil					
Óbitos p/Residência por Ano do Óbito segundo Categoria CID-10					
Categoria CID-10: J21 Bronquiolite aguda					
Faixa Etária: 1 a 4 anos					
Período: 2007-2010					
Categoria CID-10	2007	2008	2009	2010	
TOTAL	13	12	11	9	
J21 Bronquiolite aguda	13	12	11	9	

Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM
Modificada

1.2 O Vírus Sincicial Respiratório (RSV)

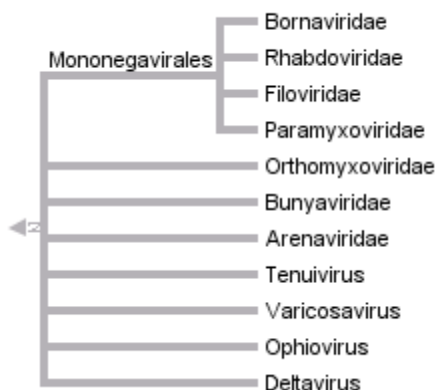


Figura 1 – Família Paramyxoviridae a qual o RSV pertence. (60)

O RSV é um vírus envelopado, com RNA de fita simples negativa, que pertence à ordem Mononegavirales, família *Paramyxoviridae*, como demonstra a Figura 1, e tem um genoma que codifica 11 proteínas. Dentre essas proteínas, duas estão presentes na superfície do vírion: a proteína de adesão (G) e a proteína de fusão (F) (7,15). As proteínas não-estruturais, NS1 e NS2, junto com as proteínas G e F, constituem os componentes-chave para o ciclo infectivo e para a evasão da resposta imune do hospedeiro. A proteína F medeia a fusão entre o vírus e a superfície da

célula-alvo e promove a formação do sincício (7).

Embora seja altamente infectivo, o RSV não induz uma memória imunológica efetiva e infecções repetidas são freqüentes. Os sintomas da infecção por RSV em adultos normalmente se manifestam como uma rinite, mas em bebês prematuros, em crianças com menos de dois anos e em idosos é comum uma infecção grave. Levando em consideração os dados epidemiológicos, o RSV é responsável por causar um problema de saúde que é extremamente caro para os pacientes, governos e sistemas de saúde (7).

Na década de 1960 Robert J Chanock e colaboradores tentaram desenvolver uma vacina contra o RSV. Esta vacina foi formulada com RSV inativado por formalina (chamado RSV-IF). Esta vacina foi administrada em crianças nos Estados Unidos ao longo de 1966. Infelizmente os testes demonstraram que esta vacina era ineficaz, não promovendo proteção às crianças. Além disso, algumas das crianças vacinadas desenvolveram um tipo de doença pulmonar aumentada quando infectadas com RSV que levou-as à internação hospitalar (16).

Por várias décadas investigou-se o motivo do fracasso desta vacina. Em 1996, Waris e colaboradores demonstraram que possivelmente com a vacinação foi induzida uma resposta imune do tipo Th2, porque foi encontrado um aumento na proliferação de células T CD4+ nos camundongos vacinados e infiltração de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) (17). Posteriormente foi demonstrado que a vacinação com o RSV-IF afeta profundamente a imunogenicidade, modificando o equilíbrio entre resposta imune protetiva e deletéria (18).

Estudos com o soro obtido de crianças imunizadas com a vacina RSV-IF mostraram que anticorpos contra as proteínas F e G foram gerados, mas eles apresentaram uma capacidade neutralizante baixa (19).

1.3 A infecção por RSV e a resposta imune inata

Durante a bronquiolite causada por RSV há o envolvimento de células epiteliais, de células do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo (7). Aparentemente o alvo inicial do RSV são as células epiteliais, onde a infecção altera a expressão de receptores da membrana plasmática envolvidos na ativação da resposta imune inata (20). Groskreutz e colaboradores demonstraram que o RSV induz a expressão de TLR3 e proteína quinase R nas células epiteliais levando ao aumento da responsividade das células epiteliais frente à infecção

(20). Além disso, já foi demonstrado que o RSV parece induzir a transcrição de genes relacionados à resposta antiviral das células epiteliais, genes estes mediados pelo NF- κ B, um fator de transcrição que leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias no tecido (20,21).

Dentre os diferentes TLRs (Receptores do tipo Toll) expressos pelas células do sistema imune inato, o complexo TLR4/CD14 é o principal receptor de reconhecimento do RSV (22). Kurt-Jones e colaboradores demonstraram que macrófagos deficientes em CD14 não produziam IL-6 na presença da proteína F do RSV, e nem macrófagos provenientes de camundongos que eram deficientes em TLR4, mostrando que a proteína F do RSV estimula o sistema imune inato através deste complexo TLR4/CD14 (22). Além disso, este grupo demonstrou que camundongos deficientes em TLR4 apresentam maiores níveis de infecção do que camundongos que tem TLR4 funcional, evidenciando que o TLR4 está relacionado com a ativação do sistema imune e consequente combate do vírus (22). Além de CD14, a ativação do TLR4 via proteína F só acontece com interação direta de MD-2, da mesma maneira que a ativação de TLR4 pelo LPS necessita de MD-2 (23). Visto que macrófagos que não expressavam MD-2 não eram ativados quando tratados com proteína F do RSV, mesmo tendo o complexo TLR4/CD14 (23).

Quando se fala em ativação de respostas imunes frente a uma infecção, pensa-se logo na presença aumentada de diversos fatores quimiotáticos e citocinas no local da infecção. Bennett e colaboradores demonstraram em seu estudo que há níveis aumentados de IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , G-CSF e MIP-1 β no lavado nasal de crianças com bronquiolite causada por RSV (24). Além disso as células epiteliais das vias aéreas, quando infectadas *in vitro* com RSV, produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação e o recrutamento do sangue para o tecido infectado de diferentes células do sistema imune, como neutrófilos (através da IL-8 produzida no tecido), monócitos (através de MCP-1, ou seja, proteína quimiotática de monócitos 1), células T de memória (através de RANTES ou CCL5) e eosinófilos (através de eotaxina) (25). A secreção muito elevada destas citocinas e quimiocinas pode contribuir para um aumento do dano às vias aéreas causadas pela infecção com RSV, e piorar o quadro pulmonar do paciente.

Os sistema imune inato aparentemente tem um papel durante a infecção por RSV. Estudos demonstraram que neutrófilos e seus produtos estão presentes nas vias aéreas de

pacientes infectados por RSV que desenvolveram doença pulmonar aumentada devido a infecção viral (26,27). Emboriadou e colaboradores demonstraram que há um nível elevado de elastase neutrofílica (enzima presente nos grânulos dos neutrófilos) no trato respiratório superior em pacientes com bronquiolite causada por RSV (28). Outro estudo demonstrou que o RSV aumenta a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) em células endoteliais durante uma infecção *in vitro*, a adesividade celular aumentada resulta numa transmigração elevada de neutrófilos para o local (29,30).

Neutrófilos humanos incubados com RSV produzem IL-8, MIP-1 α e MIP-1 β e liberam a enzima mieloperoxidase (MPO) a partir de seus grânulos, o que pode contribuir para aumentar a patologia pulmonar na bronquiolite por RSV (31).

1.4 Neutrófilos e Resposta Antiviral: Dos Mecanismos clássicos Às Redes Extracelulares de Neutrófilos

Embora a resposta antiviral seja classicamente estudada em termos de resposta imunológica adaptativa, algumas evidências científicas têm sugerido que em algum estágio inicial da infecção a imunidade inata tem um papel importante (32). Estudos mostraram um possível envolvimento dos neutrófilos em complicações pulmonares em camundongos infectados com vírus influenza (33,34), com um consequente aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no local (35). Mas estes estudos evidenciaram mecanismos clássicos de ação dos neutrófilos frente a patógenos, como a fagocitose, a liberação de enzimas proteolíticas dos grânulos dos neutrófilos, ou a liberação de espécies reativas de oxigênio (36). Brinkmann e colaboradores em 2004 demonstraram que os neutrófilos possuem outro mecanismo de ação, chamado Redes Extracelulares de Neutrófilos – *NETs* (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*) (37). Estas redes, as NETs, são estruturas extracelulares capazes de prender e matar patógenos (37,38).

O principal componente das NETs é o DNA descondensado, contendo enzimas proteolíticas presentes nos grânulos dos neutrófilos (como elastase neutrofílica, mieloperoxidase, proteinase 3, e outras), histonas e outros componentes nucleares, todos aparentemente envolvidos no mecanismo de ação destas redes (39). Diferentes estímulos

podem induzir os neutrófilos a produzirem estas redes, como lipopolissacarídeos (LPS), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), bactérias Gram-negativas e Grampositivas, fungos, parasitas e plaquetas ativadas (37,38,40,41,42,43). A produção de NETs parece ser dependente de alguns receptores da família Fc e receptores do tipo Toll (38).

Há pouca informação quanto à produção de NETs frente a uma infecção viral (32). Em 2010, Wardini e colaboradores mostraram que a produção de NETs pode ser modulada pela infecção viral, utilizando gatos infectados com o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (44). Este estudo comparou neutrófilos provenientes de gatos positivos para FeLV e negativos para FeLV, e viu que além da indução da liberação de NETs pelos neutrófilos durante a infecção, os neutrófilos dos gatos que eram positivos para FeLV e eram sintomáticos para a doença produziam estatisticamente mais NETs do que os não infectados pelo vírus, quando desafiados com promastigotos de *Leishmania* (44). Apesar destes resultados ainda não estava claro o papel direto das NETs frente a uma infecção viral.

No ano de 2011, Narasaraju e colaboradores mostraram que a grande quantidade de neutrófilos no pulmão, e a produção de NETs neste local, contribuiu para uma lesão pulmonar aguda durante a infecção pelo vírus H1N1 (Influenza A) (45). Interessante ressaltar que o grupo do Narasaraju demonstrou a indução de NETs pelo vírus Influenza tanto *in vitro* (através de co-incubação de neutrófilos com células epiteliais alveolares infectadas com Influenza A) quanto *in vivo* (através de um desafio letal com Influenza A em camundongos, analisando tanto nos alvéolos quanto nos vasos sanguíneos) (45). Além disso, as NETs induzidas pela infecção com Influenza A não são produzidas através da ativação da NADPH oxidase, mecanismo classicamente descrito anteriormente, mas ocorrem através da geração de H₂O₂, sendo um novo mecanismo de indução de NETs pelas células infectadas com o vírus (45).

Ainda, há na literatura um relato de caso com paciente idoso infectado por *H. influenzae* (46). Este paciente foi internado apresentando pneumonia severa e acabou morrendo (46). A análise da necropsia do escarro deste paciente mostrou que havia muitos neutrófilos e várias estruturas fibrosas (46). Com a técnica de fluorescência o grupo de Hamaguchi mostrou que havia DNA, histona H3 e elastase neutrofílica – todos componentes das NETs (46). Assim, fica evidente que infecções respiratórias, bacterianas ou virais, são

capazes de induzir a geração de NETs nos pulmões, o que pode resultar em maior dano pulmonar e agravamento da doença.

Pouco tempo depois, Saitoh e colaboradores demonstraram que os neutrófilos, frente a uma infecção por HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo-1), medeiam a resposta imunológica do hospedeiro (47). Utilizando-se de microscopia de super-resolução (*Superresolution Structured Illumination Microscopy*) e microscopia eletrônica de varredura foi possível detectar partículas do vírion capturadas pelas NETs dos neutrófilos (47). Além disso, foi investigada a capacidade infecciosa do HIV-1 após ser capturado pelas NETs, e constatado que a capacidade de infecção do HIV-1 após ser capturado pelas NETs diminuía significativamente, demonstrando um papel não só de contenção das NETs frente a uma infecção viral, mas também de inativação das partículas virais (47). Como os neutrófilos participam da eliminação do vírus através das NETs, este grupo investigou quais receptores dos neutrófilos estariam envolvidos nesta resposta (47). Através de tratamento com inibidores e antagonistas de TLRs conseguiram identificar que os receptores TLR7 e TLR8 dos neutrófilos medeiam a eliminação do vírus pelas NETs (47).

Recentemente, Jenne e colaboradores verificaram que os neutrófilos recrutados para os locais de infecção protegem o hospedeiro do desafio viral através da realização das NETs (32). Nesse estudo eles demonstraram por microscopia intravital que ocorre um rápido recrutamento de neutrófilos para o fígado dos camundongos depois de desafios com análogos virais e poxvírus (32). O tratamento com DNase, que degrada o principal componente das NETs, o DNA, causou perda da proteção dos animais frente à infecção viral demonstrando assim, em modelo *in vivo* murino, que quando há a presença de NETs na microvasculatura do fígado ocorre uma redução do número de células infectadas, deixando claro que as NETs são efetivas em proteger o hospedeiro de uma infecção viral (32).

Estes resultados em conjunto mostram que há cada vez mais indícios de que os neutrófilos tenham um papel importante frente às infecções virais, seja através de mecanismos clássicos de atuação, ou através deste novo mecanismo descrito recentemente, as Redes Extracelulares de Neutrófilos. Há muito ainda a ser desvendado no que diz respeito à infecção viral e neutrófilos, mas pode-se dizer que os neutrófilos que antes eram figurantes nesta história, agora passam a ter papéis importantes entre a resposta imunológica à infecções virais.

1.5 A Formação das Redes Extracelulares de Neutrófilos

O processo de geração das NETs é um processo ativo de resposta dos neutrófilos frente a diversos estímulos, inclusive patógenos (37). Fuchs e colaboradores em 2007 demonstraram que o processo de formação das NETs além de ser um processo ativo, é um processo que ocasiona a morte dos neutrófilos, o que passou-se a chamar de NETosis (48). Diferentemente da apoptose, não há a exposição de fosfatidilserina na membrana celular durante a formação das NETs, nem mesmo há fragmentação do DNA, diferenciando também da necrose (48).

As etapas da formação das NETs ainda não foram totalmente esclarecidas, mas algumas etapas gerais já estão bem claras. Basicamente, após a chegada de um determinado estímulo, neutrófilos ativados iniciam um processo de perda da integridade de sua membrana nuclear e não há mais distinção da eucromatina com a heterocromatina (48). Em seguida, ocorre a perda da integridade das membranas dos grânulos neutrofílicos, o que permite a mistura dos componentes citoplasmáticos com os nucleares e com os conteúdos dos grânulos (49). Finalmente, as NETs emergem das células através da membrana plasmática em um processo que é diferente da necrose e da apoptose (48). A Figura 2 mostra um esquema da formação das NETs.

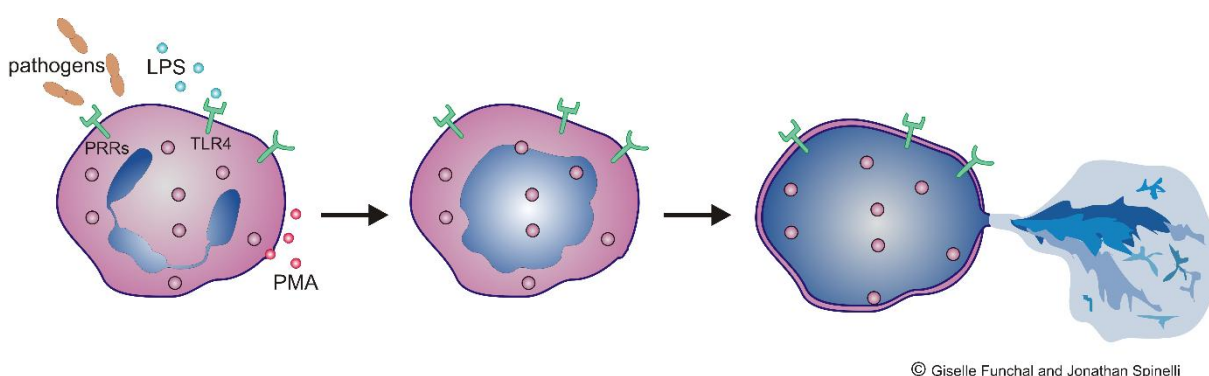


Figura 2. Esquema básico das etapas da formação das NETs.

Após a identificação dos processos básicos para a formação das NETs, descobriu-se que há possivelmente o envolvimento de outras moléculas. Por exemplo, Neeli e colaboradores propuseram que a integrina MAC-1 está envolvida com o início da formação

das NETs, sendo o primeiro grupo a demonstrar que o citoesqueleto dos neutrófilos tem papel importante na liberação das NETs e na citrulinização das histonas (50). Mas, aparentemente, dependendo do estímulo recebido pelos neutrófilos há o envolvimento de diferentes moléculas para a formação das NETs (51).

Alguns estímulos induzem NETs dependente da produção de espécies reativas de oxigênio – ROS (do inglês: Reactive Oxygen Species) através do complexo multienzimático da NADPH oxidase (49,52). É o caso do PMA, forbol 12-miristato 13-acetato (37). Fuchs e colaboradores propuseram que a produção de ROS seria um dos mecanismos iniciais para as NETs (48). A Figura 3 mostra as etapas da formação das NETs sendo que a primeira etapa é dependente da produção de ROS (53).

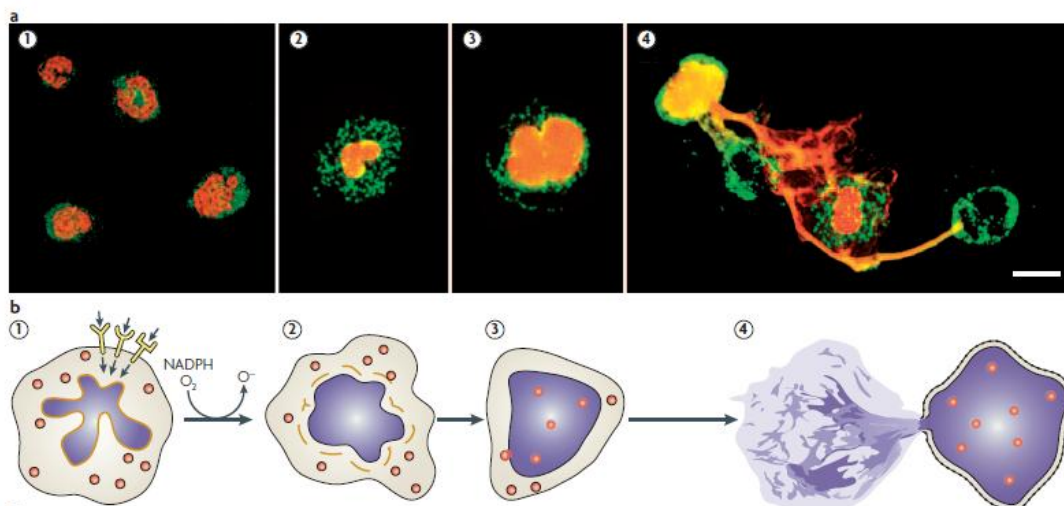


Figura 3 – Processo de formação das NETs dependente de NADPH oxidase (53)

Keshari e colaboradores demonstraram em 2013 que os neutrófilos humanos que liberam as Redes Extracelulares em resposta ao PMA produzem ROS de uma maneira dependente de NADPH oxidase (54). A fosforilação das proteínas MAPK p38 e ERK é dependente da formação do superóxido e promove a liberação das NETs (54). Interessante ressaltar que os inibidores de ERK1/2 e p38 não afetaram a geração de superóxido, sugerindo que eles estão em uma etapa posterior da formação do superóxido (54).

Apesar de muitos estudos demonstrarem que após a geração das NETs os neutrófilos morrem (NETosis) (53), Yousefi e colaboradores demonstraram que neutrófilos vivos quando estimulados podem sim realizar NETs sem morrer, liberando DNA mitocondrial (55). Este

grupo também demonstrou que apesar de não envolver a morte das células na geração das NETs, esta foi gerada de uma maneira igualmente dependente de ROS (55).

2 Hipótese

Esta dissertação tem como premissas:

- A proteína F do RSV liga ao receptor TLR4, expresso na superfície dos neutrófilos (22);
- A ativação do TLR-4 em neutrófilos leva a formação de NETs (56);
- Vírus são capazes de ativar a produção de Redes Extracelulares de Neutrófilos (32,44,45,47).

Sendo assim, a **hipótese** é que *o Vírus Sincicial Respiratório induza a produção de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs), através da ligação da proteína F ao receptor TLR-4*. A produção excessiva de NETs nos pulmões de crianças infectadas com RSV pode aumentar a patologia pulmonar na infecção, uma vez que essas redes de DNA aumentam o dano endotelial e dificultam a função pulmonar.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Caracterizar o efeito do Vírus Sincicial Respiratório e da sua proteína de Fusão sobre a formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs).

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito da proteína F do VSR sobre a formação de NETs;
- Analisar a composição (DNA e proteínas granulares) das NETs induzidas pela proteína F;
- Caracterizar o papel do receptor TLR-4 sobre a formação de NETs induzidas pela proteína F;
- Verificar se há formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou ativação da NADPH oxidase durante a formação de NETs em resposta à proteína F;
- Verificar a ativação de MAPK durante a geração das NETs.

Capítulo 2 – Artigo Científico

(Manuscrito foi submetido ao periódico “THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY”)

Full Title: TLR-4 mediates NADPH oxidase- and MAPK-dependent neutrophil extracellular trap formation induced by Respiratory Syncytial Virus Fusion protein¹

Running Title: RSV F protein induces NET formation

Giselle A. Funchal*†§, Natália Jaeger†§, Rafael S. Czepielewski†§, Mileni S. Machado*§, Renato T. Stein‡¶, Cristina B. C. Bonorino†§, Bárbara N. Porto*¶2

* Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, † Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, ‡ Laboratory of Pediatric Respiriology, Institute of Biomedical Research (IPB), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS); § School of Biosciences (FABIO), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS); ¶ School of Medicine (FAMED), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract:

Acute viral bronchiolitis caused by Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the most common respiratory illness in children in the first years of life generating large numbers of hospitalizations and huge costs to health systems. RSV Fusion (F) protein is essential for viral infective cycle. Neutrophils and their products are present in the airways of RSV-infected patients who developed increased lung disease. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) are formed by the release of granular and nuclear contents of neutrophils in the extracellular space in response to different stimuli. Recent studies proposed a role for NETs in viral infections, then we investigated whether RSV F protein would be able to induce NETs from human neutrophils. F protein was able to induce NET formation in vitro in a concentration-dependent manner. Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase were co-expressed on NETs induced by F protein. RSV F protein-induced NET release was mediated by TLR-4. Importantly, the activation of TLR-4 by F protein was not attributable to LPS contamination, whereas the treatment with polymyxin B did not inhibit F protein-induced NET formation. F protein stimulated extracellular DNA release through NADPH Oxidase-derived ROS generation and ERK and p38 MAPK phosphorylation. Together, these data provide evidence to support a signaling mechanism activated by RSV F protein to induce NET formation. We propose the targeting of TLR-4 or the use of DNase as possible novel therapeutic approaches to help control RSV-induced inflammatory consequences and pathology.

Introduction:

Respiratory Syncytial Virus (RSV)-induced acute bronchiolitis is the most prevalent disease in children under 2 years old, which causes a huge impact in hospitalizations and costs to the health system worldwide (1). Almost 70% of children are infected with RSV during the first year of life, and by age 3, near 100% of children have experienced at least one infection with this virus (2,3). RSV is a single stranded RNA virus, whose genome encodes up to 11 proteins (4). The Fusion (F) protein is present at the virion surface and mediates fusion of the viral envelope with the target cell membrane during virus entry (5). Only membrane-bound protein is indispensable for virus replication in vitro and in vivo (6), and this protein is the primary target for antiviral drug and vaccine development (7,8). It has been demonstrated that RSV F protein activates the pattern recognition receptors TLR-4 and CD14, inducing pro-inflammatory cytokine secretion (9). In addition, it has been recently shown that RSV F protein directly interacts with MD-2-TLR-4 complex (10).

One of the characteristic features of RSV infection is the large numbers of neutrophils in the lower airways. There is a growing body of evidence showing that neutrophils and their products are present in the airways of patients and animal models with RSV and bronchiolitis (11-13), and also viral-induced asthma (14,15). Together, these studies provide evidence that neutrophils may contribute to the pathology observed in the airways.

Aside from the traditional mechanisms of phagocytosis, generation of reactive oxygen species (ROS) and degranulation, neutrophils can also produce neutrophil extracellular traps (NETs), an important strategy to immobilize and kill pathogens. NETs are formed by decondensed chromatin fibers decorated with antimicrobial proteins, such as neutrophil elastase and myeloperoxidase (16). NET-inducing stimuli include cell surface components of

bacteria, such as LPS, whole bacteria, fungi, protozoan parasites, cytokines, and activated platelets, among others (16-20). More recently, studies have demonstrated that viruses are able to induce NET formation. The production of NETs is modulated in neutrophils isolated from cats infected with feline immunodeficiency virus (21). NETs induced by Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) are crucial for the elimination of virus (22). NET release in the liver vasculature protects host cells from poxvirus infection (23). However, an excess of NET production contributes to the pathology of respiratory viral infections. NET formation is potently induced in lungs of mice infected with Influenza A virus, in areas of alveolar destruction (24), suggesting a putative role for NETs in lung damage.

We show that RSV F protein was able to induce NET formation dependently on TLR-4 receptor activation. Moreover, NETs induced by F protein were decorated with neutrophil elastase and myeloperoxidase, granule proteins that can damage tissues. F protein potently induced NADPH Oxidase-derived ROS production and this was crucial for NET generation. Also, F protein induced NET production in ERK and p38 MAPK phosphorylation-dependent manner. Together, these results provide compelling evidence to support a signaling mechanism activated by RSV F protein to induce NET formation. The excessive production of NETs in the airways of children infected with RSV may worsen lung pathology and impair lung function.

Materials and Methods

REAGENTS

Human recombinant RSV Fusion protein was purchased from Sinobiological Inc. PMA and Protease-free DNase 1 were from Promega. Dextran, LPS O111:B4 from *Escherichia coli*, Diphenyleneiodonium (DPI), N-acetyl-L-cysteine (NAC), and Histopaque-1077 were obtained from Sigma-Aldrich. ECORI and HINDIII were from Invitrogen. The inhibitor of TLR4-receptor (Anti-human Toll-like Receptor 4 (CD 284)) were from eBioscience. PD98059 and SB203580 were from Cayman Chemical. Polymyxin B was from Millipore. The 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA) was from Molecular Probes. RPMI 1640 was from Cultilab, and FCS was from Gibco.

ETHICS STATEMENT

This study was approved under Ethics protocol no. CEP 310.623.

HUMAN NEUTROPHIL ISOLATION

Whole blood was collected into heparin-treated tubes. Erythrocytes were removed using Dextran sedimentation followed by two rounds of hypotonic lysis. Neutrophils were isolated from the resulting cell pellet using Histopaque-1077 density centrifugation. Neutrophils were resuspended in RPMI 1640 medium. Under all experimental conditions, > 99% cells were viable, as assessed by Trypan Blue exclusion assay.

QUANTIFICATION OF NET RELEASE

Neutrophils (2×10^6 /mL) were stimulated with F protein (1 μ g/mL), LPS (100 ng/mL), PMA (50 nM) or medium alone. After 1 h, restriction enzymes (ECORI and HINDIII, 20 U/mL each) were added to the cultures, which were then maintained for 2 h at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA HS kit (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. To evaluate the involvement of TLR-4, NADPHox-derived ROS, and MAPK (ERK and p38) on F protein-induced NET formation, neutrophils were pretreated with selective inhibitors at 37°C under 5% CO₂, as indicated in figure legends.

IMMUNOFLUORESCENCE

Neutrophils (2×10^5 /300 μ L) were incubated with F protein (1 μ g/mL), LPS (100 ng/mL), PMA (50 nM) or medium alone for 3 h at 37°C under 5% CO₂ in 8-chamber culture slides (BD Falcon). After this period, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and stained with Hoechst 33342 (1:2000; Invitrogen) and anti-elastase (1:1000; Abcam), followed by anti-rabbit Cy3 (1:500; Invitrogen) or anti-myeloperoxidase PE (1:1000; BD Biosciences) antibodies. Confocal images were taken in a Zeiss LSM 5 Excite.

ASSAY OF INTRACELLULAR REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION

The determination of intracellular ROS generation was based on the oxidation of 0.5 μ M 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) to yield an intracellular fluorescent compound. Neutrophils (10^6 cells/microtube) were pretreated with NAC (1 mM) or DPI (10 μ M) and stimulated with F protein for 60 minutes at 37°C under 5% CO₂. Afterwards, cells were incubated with CM-H₂DCFDA for 30

minutes at 37°C under 5% CO₂. Cytosolic ROS production was measured by flow cytometry using FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson) with BD FACSDiva software and analyzed using FlowJo v 7.5.

EXPRESSION OF PHOSPHO-ERK 1/2 AND PHOSPHO-P38

The expression of phospho-ERK 1/2 and phospho-p38 in human neutrophils was measured by flow cytometry using BD Phosflow (BD Biosciences) protocol for human whole blood sample. Neutrophils were stimulated with F protein (1 μM) for 5 minutes. Briefly cells were fixed in Phosflow Buffer I for 10 minutes at 37°C. After washing, permeabilization was performed with Phosflow Perm Buffer II for 30 minutes on ice. Afterwards, neutrophils were washed twice and stained with APC anti-phospho-ERK 1/2 and Alexa 488 anti-phospho-p38 antibodies for 30 minutes on ice. All data was accessed by flow cytometry using FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson) with BD FACSDiva software and analyzed using FlowJo v 7.5.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as mean ± SEM. Results were analyzed using a statistical software package (GraphPad Prim 5). Statistical differences among the experimental groups were evaluated by analysis of variance with Newman-Keuls correction or with Student's t Test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

RSV Fusion protein induces NET formation.

It has been previously shown that neutrophils and their products are present in the airways of patients and animals infected with RSV (11,13,14). Furthermore, recent studies demonstrated that viruses are able to induce NET formation (22,23). We hypothesized that RSV Fusion protein could stimulate NET production, so we tested whether F protein would have a dose-dependent effect on NET formation in vitro. We stimulated human neutrophils with different concentrations of F protein and after 3 h of incubation we quantified extracellular DNA in culture supernatants. RSV F protein was able to induce NET formation in a dose-dependent manner, with the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inducing the best response (Fig. 1A). To compare the effect of F protein with the effect of classical inducers of NETs, we stimulated neutrophils with LPS and PMA. F protein showed an effect comparable to both LPS and PMA (Fig. 1B), indicating that this viral protein is as potent in inducing NET generation as the typical inducers. In an alternative approach to demonstrate the induction of extracellular DNA by F protein, we stimulated neutrophils with medium alone, LPS, PMA or F protein and performed confocal laser scanning microscopy analysis. All stimulants (F protein, PMA and LPS) were able to induce NET formation compared to medium alone (Fig. 1C-F).

Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase co-localize with extracellular DNA induced by F protein.

Previous studies have demonstrated the expression of antimicrobial proteins on NETs induced by different stimuli, including bacteria, fungi, and virus (16,22,25,26). Then, we sought to characterize the composition of NETs induced by RSV F protein, analyzing it by

immunostaining. F protein induced the formation of NETs containing the proteins from azurophilic granules, neutrophil elastase (NE) (Fig. 2A) and myeloperoxidase (MPO) (Fig. 2B).

The effect of F protein on NETs generation is not inhibited by polymyxin B.

A major concern when characterizing any putative activator of TLR is the possible presence of microbial-derived contaminants, such as LPS. LPS is the prototype TLR-4 agonist and it is among the most potent pro-inflammatory stimuli both in vivo and in vitro. To test whether the effect of F protein could be due to LPS contamination, we stimulated neutrophils with F protein or LPS in the presence or absence of polymyxin B and quantified extracellular DNA in culture supernatants. As expected, LPS-induced NET release was inhibited by polymyxin B, which has been previously shown to bind and neutralize LPS (27). In contrast, F protein was able to induce NET formation in the presence of polymyxin B (Fig. 3A), indicating that the effect of F protein is not attributable to LPS contamination. Next, to ensure that the structures visualized and quantified were in fact NETs, we stimulated neutrophils with F protein or LPS, as a control, and treated the cells with protease-free DNase. DNase treatment was able to dismantle NETs induced by both LPS and F protein (Fig. 3B), indicating that those structures were made of DNA, and consequently NETs.

F protein-induced NET formation is dependent on TLR-4 activation.

It has been previously demonstrated that RSV F protein activates the pattern recognition receptors TLR-4–CD14–MD-2 to induce the activation of the transcription factor NF- κ B and pro-inflammatory cytokine secretion (9,10). We hypothesized that F protein could activate TLR-4 to induce NET production. We used a blocking antibody against TLR-4 to define the

involvement of this receptor on F protein-induced NET formation. Pretreatment of neutrophils with anti-TLR4 significantly inhibited the effect of F protein on NET release (Fig. 4A). As an alternative approach to show the role of TLR-4 on NET formation by F protein, we visualized DNA fibers after pretreatment of cells with anti-TLR4. The release of DNA induced by F protein after pretreatment with the antibody is completely blocked (Fig. 4B). These results indicate that RSV F protein induces NET formation dependently on TLR-4 activation.

Essential role for NADPH Oxidase-derived ROS on F protein-induced NET generation.

It has been previously shown the dependence of ROS generation in NET release induced by various agents (25,28,29). To characterize the involvement of ROS on F protein-induced NET production, we treated neutrophils with inhibitors of ROS generation. Treatment with NAC blocked NET formation induced by F protein (Fig. 5A) and abrogated F protein-induced ROS generation (Fig. 5B). Similarly, treatment with DPI, a NADPH Oxidase inhibitor, significantly inhibited F protein-stimulated NET production (Fig. 5C) and abolished ROS generation induced by F protein (Fig. 5D). Together, these results indicate that F protein stimulates NET production dependently on NADPH Oxidase-derived ROS generation.

F protein activates ERK and p38 MAPK to induce NET formation.

Recent studies have shown that ERK and p38 MAPK are indispensable for NET production (30,31). To investigate the role of these MAPK on F protein-induced NET formation, we treated neutrophils with selective inhibitors of ERK and p38 MAPK. Pretreating neutrophils with PD98059 and SB203580, ERK and p38 inhibitors respectively, profoundly decreased DNA release induced by F protein (Fig. 6A and B), pointing a critical role for these MAPK on F protein-induced NET formation. We also evaluated whether treatment of neutrophils

with F protein would activate these signaling pathways, analyzing phosphorylation of ERK 1/2 and p38. Our results support the findings that F protein rapidly activates phosphorylation of these signaling pathways (Fig. 6C and D), leading to NET release.

Discussion

In this study, we analyzed the mechanisms involved in RSV Fusion protein-induced NET formation. RSV F protein was able to induce NET release in a concentration-dependent fashion with both NE and MPO expressed on DNA fibers. This viral protein caused the release of extracellular DNA dependently on TLR-4 activation, NADPH Oxidase-derived ROS production and ERK and p38 MAPK phosphorylation. Together, these results demonstrate a coordinated signaling pathway activated by F protein that led to NET production.

Neutrophils are key players in microbial containment since they are able to phagocytose microbes, deliver antimicrobial molecules in the phagolysosome and release neutrophil extracellular traps that entrap and kill a multitude of microorganisms (16,32). NETs are formed by a variety of stimuli, including bacteria, fungi, parasites, cytokines and endogenous proteins (16,33-35). Recent studies proposed a role for NETs in the control of viral infections (22,23). Neutrophil-derived NETs were able to capture HIV-1 particles and this effect was dependent on TLR-7 and TLR-8 activation (22). Systemic injection of viral TLR ligands or poxvirus infection led to accumulation of neutrophils in liver sinusoids that formed aggregates with platelets and released NETs into the vessels (23). These studies point out a beneficial role for NET in controlling viral infection and neutralizing the viruses. However, the excessive formation of NETs could be pathogenic to the host, mainly in respiratory viral infections, because NETs could expand more easily in the pulmonary alveoli, causing lung injury. It has been recently shown that Influenza A virus induced the formation of NETs, entangled with alveoli in areas of tissue injury, suggesting their potential link with lung damage (24). We show that a respiratory virus glycoprotein potently induced NET

formation, an effect comparable to the classical inducers of NETs, such as PMA and LPS. RSV F protein caused the release of NETs coated with the granular proteins NE and MPO. These proteins have been shown to be important for NET formation (36,37) and to possess microbicidal activities (19,22,38). MPO present in NETs provides the bactericidal activity against *S. aureus* (38) and promotes the elimination of HIV-1 (22). NE expressed in NETs induced by the pathogenic mold *A. fumigatus* helps to inhibit its growth (19). However, the antimicrobial proteins released with NETs are directly toxic to tissues and the massive production of NETs may damage host tissues (39), for instance elastase cleaves host proteins at the site of inflammation or infection (40). Neutrophils actively producing NETs in the lung tissue disturb microcirculation and elicit pulmonary dysfunction (41). Moreover, NETs directly induce epithelial and endothelial cell death (42). NE and MPO expressed on DNA fibers stimulated by F protein could exacerbate lung pathology induced by RSV infection, through the destruction of connective tissue, degradation of endothelial cell matrix heparan sulfate proteoglycan, resulting in post infection tissue injury (41).

The fibrous structure of NETs is essential for providing high local concentrations of antimicrobial proteins (43), but it can also be detrimental for host tissues, since it can impair lung function (44). Furthermore, the characterization of NETs structure is a great concern when studying these DNA lattices and their function. With two different approaches, the quantification of extracellular DNA and fluorescence microscopy, we demonstrated that RSV F protein-induced NETs were dismantled by DNase treatment, confirming that their structural backbone is chromatin.

Together with G protein, F protein comprises the major glycoprotein on RSV surface and these proteins are the main targets of neutralizing antibodies against RSV. F protein mediates the fusion of virus with the target cell and it is essential for viral replication both in

vivo and in vitro (6), being considered the primary target for vaccine and antiviral drug development. Monoclonal antibodies to F protein passively protect against RSV challenge in an animal model and reduce the severity of infection in premature and newborn babies (45,46). A major feature of RSV infection is the large numbers of neutrophils recruited to the airways of patients and animals (11-13,47). This phenomenon is more profound than in any other respiratory viral infection in childhood, in which mostly alveolar macrophages and T cells prevail. Although neutrophils are essential effector cells of the innate immune system and have a crucial role in the clearance of microorganisms (48), it has been suggested that neutrophils may contribute to the pathology observed in the airways of patients and animals infected with RSV (49). Moreover, it has been shown that RSV is able to activate neutrophils, inducing degranulation and IL-8 secretion (50) and also inhibit neutrophil spontaneous apoptosis (51). It is plausible to reason that these effects could be mediated by F protein binding to TLR-4, once it has been demonstrated that F protein binds to TLR-4/CD14 and physically interacts with MD-2, an essential accessory molecule for TLR-4 activation (9,10). F protein induced NET formation in a TLR-4-dependent manner, since the treatment of neutrophils with a blocking antibody against TLR-4 profoundly inhibited extracellular DNA production. Our findings are in agreement with studies showing the activation of TLR-4 by different stimuli to induce NET generation (16,18,33). Importantly, the activation of TLR-4 by F protein was not attributable to LPS contamination, whereas the treatment with polymyxin B did not inhibit NET formation induced by the protein, but did inhibit the effect of LPS on NET generation.

Stimulation of TLR-4 initiates a signal transduction cascade that induces the assembly of NADPH Oxidase complex. Several studies indicate that ROS are required for NET formation (25,28,29). Then, we sought to investigate whether F protein would be able to

stimulate ROS production in neutrophils and whether this induction would be necessary for NET generation. Treatment with the ROS scavenger NAC abolished F protein-induced ROS and extracellular DNA production. Also, the oxidase inhibitor DPI, at the typical concentration needed to block the respiratory burst, completely blocked ROS production and NET formation induced by F protein. Thus, F protein-induced NET release is mediated by ROS generation. How ROS contribute to DNA release is still in debate. One possibility is that they promote the morphological changes seen in neutrophils secreting NETs (36). In addition, it has been suggested that ROS can act as second messengers (52). The requirement of ROS for NET generation induced by RSV F protein indicate that ROS act as second messengers for this stimulus, likely promoting downstream events that culminate in DNA release.

Recent evidence shows that NET formation needs additional signaling, of which ERK and p38 MAPK are involved. Furthermore, activation of these MAP kinases is downstream of NADPH Oxidase-derived ROS production (30,31). We hypothesized that F protein would activate ERK and p38 MAPK to stimulate extracellular DNA release. Treatment of neutrophils with selective inhibitors of ERK and p38 MAPK almost abolished NET induction by F protein. Importantly, F protein was able to activate the phosphorylation of these MAP kinases. Taken together, these results indicate that RSV F protein-induced NET formation is mediated by the phosphorylation of p38 MAPK and ERK.

In conclusion, our study demonstrates that RSV F protein is able to induce NET release through specific signaling pathways. This induction occurs through activation of TLR-4 and it is dependent on NADPH Oxidase-derived ROS generation and on ERK and p38 MAPK phosphorylation. Neutrophils play an important role in the immunopathology during RSV infection and are continuously recruited from bone marrow and blood stream to the lungs. The binding of RSV F protein to TLR-4 on neutrophils could induce the massive

production of NETs, which can fill the lungs and impair lung function and consequently aggravate the inflammatory symptoms of infection in young children and babies. We propose that targeting the binding of TLR-4 by F protein or the use of DNase may potentially lead to novel therapeutic approaches to help control RSV-induced inflammatory consequences and pathology.

Acknowledgments

The authors thank Rodrigo Godinho de Souza, Taiane Garcia for excellent technical assistance, Ricardo Breda for technical assistance with confocal microscopy and Stéfanie Muraro, Patrícia Araújo and Magáli Mocellin for the lab assistance.

References

1. Stott, E. J., and G. Taylor. 1985. Respiratory Syncytial Virus. Brief Review. *Arch. Virol.* 84(1-2): 1-52.
2. Welliver, R. C. 2003. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J. Pediatr.* 143: S112-S117.
3. Mejias, A., S. Chávez-Bueno, H. S. Jafri, and O. Ramilo. 2005. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24(11): S189-S197.
4. Bueno, S. M., P. A. González, R. Pacheco, E. D. Leiva, K. M. Cautivo, H. E. Tobar, J. E. Mora, C. E. Prado, J. P. Zúñiga, J. Jiménez, C. A. Riedel, and A. M. Kalergis. 2008. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 8: 1320-1329.
5. Kahn, J. S., M. J. Schnell, L. Buonocore, and J. K. Rose. 1999. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* 254: 81-91.
6. Karron, R. A., D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, J. E. Adamus, M. L. Clements-Mann, D. O. Harris, V. B. Randolph, S. A. Udem, B. R. Murphy, and M. S. Sidhu. 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV sub-group B mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13961-13966.
7. Johnson P. R. Jr., R. A. Olmsted, G. A. Prince, B. R. Murphy, D. W. Alling, E. E. Walsh, and P. L. Collins. 1987. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J. Virol.* 61: 3163-3166.

8. Zhao, X., M. Singh, V. N. Malashkevich, and P. S. Kim. 2000. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 14172-14177.
9. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1(5): 398-401.
10. Rallabhandi, P., R. L. Phillips, M. S. Boukhvalova, L. M. Pletneva, K. A. Shirey, T. L. Gioannini, J. P. Weiss, J. C. Chow, L. D. Hawkins, S. N. Vogel, J. C. G. Blanco. 2012. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein-induced Toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling is inhibited by the TLR-4 antagonists *Rhodobacter sphaeroides* LPS and Eritoran (E5564) and requires direct interaction with MD-2. *MBio.* 3(4): 1-8.
11. van Schaik, S. 1998. Respiratory syncytial virus affects pulmonary function in BALB/c mice. *J. Infect. Dis.* 177: 269-276.
12. McNamara, P. S., P. Ritson, A. Selby, C. A. Hart, and R. L. Smyth. 2003. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch. Dis. Child.* 88: 922-926.
13. Emboriadou, M., M. Hatzistilianou, Ch. Magnisali, A. Sakelaropoulou, M. Exintari, P. Conti, V. Aivazis. 2007. Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 37(1): 79.
14. Teran, L. M., S. L. Johnston, J. M. Schroder, M. K. Church, and S. T. Holgate. 1997. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 1362.

15. Schwarze, J., E. Hamelmann, K. L. Bradley, K. Takeda, and E. W. Gelfand. 1997. Respiratory Syncytial Virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J. Clin. Invest.* 100: 226-233.
16. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil Extracellular Traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
17. Guimarães-Costa, A. B., M. T. C. Nascimento, G. S. Froment, R. P. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceição-Silva, and E. M. Saraiva. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 6748-6753.
18. Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C.J. Doig, F.H. Green, and P. Kubes. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13: 463-469.
19. McCormick, A., L. Heesemann, J. Wagener, V. Marcos, D. Hartl, J. Loeffler, J. Heesemann, and F. Ebel. 2010. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 12: 928-936.
20. Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8: 668-676.
21. Wardini, A. B., A. B. Guimarães-Costa, M. T. C. Nascimento, N. R. Nadaes, M. G. M. Danelli, C. Mazur, C. F. Benjamim, E. M. Saraiva, and L. H. Pinto-da-silva. 2010. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J. Gen. Virol.* 91: 259-264.

22. Saitoh, T., J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, and S. Akira. 2012. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe* 12: 109-116.
23. Jenne, C. N., C. H. Y. Wong, F. J. Zemp, B. McDonald, M. M. Rahman, P. A. Forsyth, G. McFadden, and P. Kubes. 2013. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* 13: 169-180.
24. Narasaraju, T., E. Yang, R. P. Samy, H. H. Ng, W. P. Poh, A.-A. Liew, M. C. Phoon, N. van Rooijen, and V. T. Chow. 2011. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of Influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.* 179(1): 199-210.
25. Parker, H., M. Dragunow, M. B. Hampton, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. 2012. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 92: 841-849.
26. Urban, C. F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5(10): e1000639.
27. Tsuzuki, H., T. Tani, H. Ueyama, and M. Kodama. 2001. Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappa B in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J. Surg. Res.* 100: 127-134.
28. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176: 231-241.

29. Remijsen, Q., T. Vanden Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, and P. Vandenabeele. 2011. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21: 290-304.
30. Hakkim, A., T. A. Fuchs, N. E. Martinez, S. Hess, H. Prinz, A. Zychlinsky, and H. Waldmann. 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophils extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7: 75-77.
31. Keshari. R. S., A. Verma, M. K. Barthwal, and M. Dikshit. 2012. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J. Cell. Biochem.* 114: 532-540.
32. Segal, A. W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23:197-223
33. Tadie, J., H. Bae, S. Jiang, D. W. Park, C. P. Bell, H. Yang, J. Pittet, K. Tracey, V. J. Thannickal, E. Abraham, and J. W. Zmijewski. 2013. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 304: L342-L349.
34. Kaplan, M. J. and M. Radic. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edge swords if innate immunity. *J. Immunol.* 189: 2689-2695.
35. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *TRENDS Immunol.* 30 (11): 513-521.
36. Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky, 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191: 677-691.
37. Metzler, K. D., T. A. Fuchs, W. M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos, and A. Zychlinsky. 2011. Myeloperoxidase is required for

neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117 (3): 953-959.

38. Parker, H., M. Dragunow, M. B. Hampton, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. 2012. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 92(4): 841-849.

39. Cheng, O. Z. and Palaniyar. 2013. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front. Immunol.* 4: 1-13.

40. Fujie, K., T. Shinguh, N. Inamura, R. Yasumitsu, M. Okamoto, and M. Okuhara, 1999. Release of Neutrophil elastase and its role in tissue injury in acute inflammation: effect of the elastase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 374: 117-125.

41. Lögsters, T., S. Margraf, J. Altrichter, J. Cinatl, S. Mitzner, J. Windolf, and M. Scholz. 2009. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med. Microbiol. Immunol.* 198-211-219.

42. Saffarzadeh, M., C. Juenemann, M. A. Queisser, G. Lochnit, G. Barreto, S. P. Galuska, J. Lohmeyer, and K. T. Preissner. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 7 (2): e32366.

43. Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(8): 577-582.

44. Marcos, V., Z. Zhou, A. O. Yildirim, A. Bohla, A. Hector, L. Vitkov, E. Wiedenbauer, W. D. Krautgartner, W. Stoiber, B. H. Belohradsky, N. Rieber, M. Kormann, B. Koller, A. Roscher, D. Ross, M. Griese, O. Eickelberg, G. Döring, M. A. Mall, and D. Hartl. 2010. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat. Med.* 16(9): 1018-1023.

45. The IMPact-RSV Study Group. 1998. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 102: 531-537.
46. Johnson, S., C. Oliver, G. A. Prince, V. G. Hemming, D. S. Pfarr, S. C. Wang, M. Dormitzer, J. O'Grady, S. Koenig, J. K. Tamura, R. Woods, G. Bansal, D. Couchenour, E. Tsao, W.C. Hall, and J.F. Young. 1997. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 176: 1215-1224.
47. Stoppelenburg, A. J., V. Salimi, M. Hennis, M. Plantinga, R. Huis in't Veld, J. Walk, J. Meerding, F. Coenjaerts, L. Bont, and M. Boes. Local IL-17A potentiates early neutrophil recruitment to the respiratory tract during severe RSV infection. *PLoS ONE* 8 (10): e78461.
48. Nathan. C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (3): 173-182.
49. Stokes, K. L., M. G. Currier, K. Sakamoto, S. Lee, P. L. Collins, R. K. Plemper, and M. L. Moore. 2013. The respiratory syncytial virus fusion protein and neutrophils mediate the airway mucin response to pathogenic respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* 87 (18): 10070-10082.
50. Jaovisidha, P., M. E. Peeples, A. A. Brees, L. R. Carpenter, and J. N. Moy. 1999. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. *J. Immunol.* 163: 2816-2820.
51. Lindemans, C. A., P. J. Coffey, I. M. M. Schellens, P. M. A. Graaff, J. L. L. Kimpen, and L. Koenderman. 2006. Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a Phosphatidylinositol 3-Kinase and NF- κ B-dependent mechanism. *J. Immunol.* 176: 5529-5537.

52. Tonks, N. K. 2005. Redox redux: revisiting PPTs and the control of cell signaling. *Cell* 121: 667-670

Footnotes

¹ This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant no. 472406/2010-8, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) grant no. 11/1904-1. G. A. F., N. J. and R. S. C. were supported by studentships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

² Address correspondence and reprint requests to Dr Bárbara N. Porto, Laboratory of Clinical and Experimental Immunology - Centro Infantil, Institute of Biomedical Research (IPB) - PUCRS, 6690 Ipiranga Ave., 2° floor, Room 31, zip code: 90610-000 - Porto Alegre, RS, Brazil, e-mail: barbara.porto@pucrs.br or bnporto@hotmail.com.

Figure Legends

Fig. 1. RSV Fusion protein induces NET formation. (A) Human neutrophils (2×10^6 /mL) were stimulated with RSV F protein (0,1 – 5 μ g/mL), PMA (100 nM) or medium alone for 1h at 37°C with 5% CO₂. (B) Neutrophils were stimulated with PMA (100 nM), LPS (100 ng/mL), F protein (1 μ g/mL) or medium for 1h at 37°C with 5% CO₂. After that, restriction enzymes were added to cultures, which were maintained for 2h at 37°C with 5% CO₂. NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA kit. Data are representative of at least 3 independent experiments performed in triplicates and represent mean \pm SEM. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 compared to negative control (NCtrl). (C-F) Neutrophils (2×10^5 /300 μ L) were stimulated with (C) medium, (D) LPS (100 ng/mL), (E) PMA (100 nM) or (F) F protein (1 μ g/mL) for 3 h at 37°C with 5% CO₂. Cells were then fixed with 4% PFA and stained with Hoechst 33342 (1:2000). Images were taken in a Zeiss LSM 5 Excite. Image is representative of at least 4 independent experiments. Scale bars = 50 μ m.

Fig. 2. NE and MPO co-localize with extracellular DNA induced by F protein. Neutrophils (2×10^5 /300 μ L) were stimulated with F protein (1 μ g/mL) for 3 h at 37°C with 5% CO₂. Cells were fixed with 4% PFA and stained with: (A) Hoechst 33342 (1:2000), anti-elastase (1:1000), followed by anti-rabbit Cy3 (1:500) antibodies; (B) Hoechst 33342 (1:2000), anti-myeloperoxidase PE (1:1000) antibody. Overlay of the fluorescence images are shown in the last panels. Confocal images were taken in a Zeiss LSM 5 Excite. Image is representative of 2 independent experiments. Scale bars = 50 μ m.

Fig. 3. The effect of F protein on NETs generation is not inhibited by polymyxin B.

Human neutrophils (2×10^6 /mL) were stimulated with: (A) F protein (1 μ g/mL) or LPS (100 ng/mL) in the presence or absence of polymyxin B (Pmx B, 1 μ g/mL); (B) F protein (1 μ g/mL) or LPS (100 ng/mL) in the presence or absence of Dnase-1 (100U/mL) for 1h at 37°C with 5% CO₂. After that, restriction enzymes were added to cultures, which were maintained for 2h at 37°C with 5% CO₂. NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA kit. Data are representative of 2 independent experiments performed in triplicates and represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to negative control (NCtrl); # $p < 0.05$ compared to LPS- or F protein-treated cells.

Fig. 4. F protein-induced NET formation is dependent on TLR-4 activation.

(A) Human neutrophils (2×10^6 /mL) were pretreated with anti-TLR4 (10 μ g/mL) or isotype-matched (10 μ g/mL) antibodies for 1 h and stimulated with F protein (1 μ g/mL) or medium for 1h at 37°C with 5% CO₂. Afterwards, restriction enzymes were added to cultures, which were maintained for 2h at 37°C with 5% CO₂. NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA kit. Data are representative of 2 separate experiments performed in triplicates and represent mean \pm SEM. * $p < 0.001$ compared to negative control (NCtrl); # $p < 0.05$ compared to F protein-treated cells. (B) Neutrophils (2×10^5 /300 μ L) were pretreated with anti-TLR4 (10 μ g/mL) for 1 h at 37°C with 5% CO₂ and stimulated with F protein (1 μ g/mL) or medium for 3 h at 37°C with 5% CO₂. Cells were fixed with 4% PFA and stained with Hoechst 33342 (1:2000). Confocal images were taken in a Zeiss LSM 5 Excite. Image is representative of 2 independent experiments. Scale bars =50 μ m.

Fig. 5. Essential role for NADPH Oxidase-derived ROS on F protein-induced NET generation. (A,C) Neutrophils ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated with NAC (1 mM) or DPI (10 μM) for 1 h and stimulated with F protein (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1h at 37°C with 5% CO_2 . Afterwards, restriction enzymes were added to cultures, which were maintained for 2h at 37°C with 5% CO_2 . NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA kit. Data are representative of 2 separated experiments performed in triplicates and represent mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ compared to negative control (NCtrl); # $p < 0.001$ compared to F protein-treated cells. (B,D) Neutrophils ($1 \times 10^6/\text{microtube}$) were pretreated with NAC (1 mM) or DPI (10 μM) for 1 h, stimulated with F protein (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h at 37°C with 5% CO_2 and incubated with 1 μM CM- H_2DCFDA for 30 min. ROS generation was analyzed by flow cytometry using FACSCanto II flow cytometer. Neutrophils gate was based on FSC x SSC distribution. Data are representative of 2 independent experiments performed in triplicates with similar results.

Fig. 6. F protein activates ERK and p38 MAPK to induce NET formation. (A,B) Neutrophils ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated with PD98059 (30 μM) or SB203580 (10 μM) for 1 h and stimulated with F protein (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1h at 37°C with 5% CO_2 . Afterwards, restriction enzymes were added to cultures, which were maintained for 2h at 37°C with 5% CO_2 . NETs were quantified in culture supernatants using Quant-iT dsDNA kit. Data are representative of 2 separate experiments performed in triplicates and represent mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ compared to negative control (NCtrl); # $p < 0.001$ compared to F protein-treated cells. (C,D) Neutrophils ($1 \times 10^6/\text{mL}$) were stimulated with RSV F protein (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 min at 37°C with 5% CO_2 and stained for phosphorylated proteins (ERK 1/2 and p38 MAPK), according to Materials and Methods. Proteins phosphorylation was analyzed by flow

cytometry using FACSCanto II flow cytometer. Neutrophils gate was based on FSC x SSC distribution. Phosphorylation of protein pathways are presented as fold increase relative to unstimulated neutrophils (NCtrl). Data are representative of 2 separate experiments with similar results.

Figures:

Figure1:

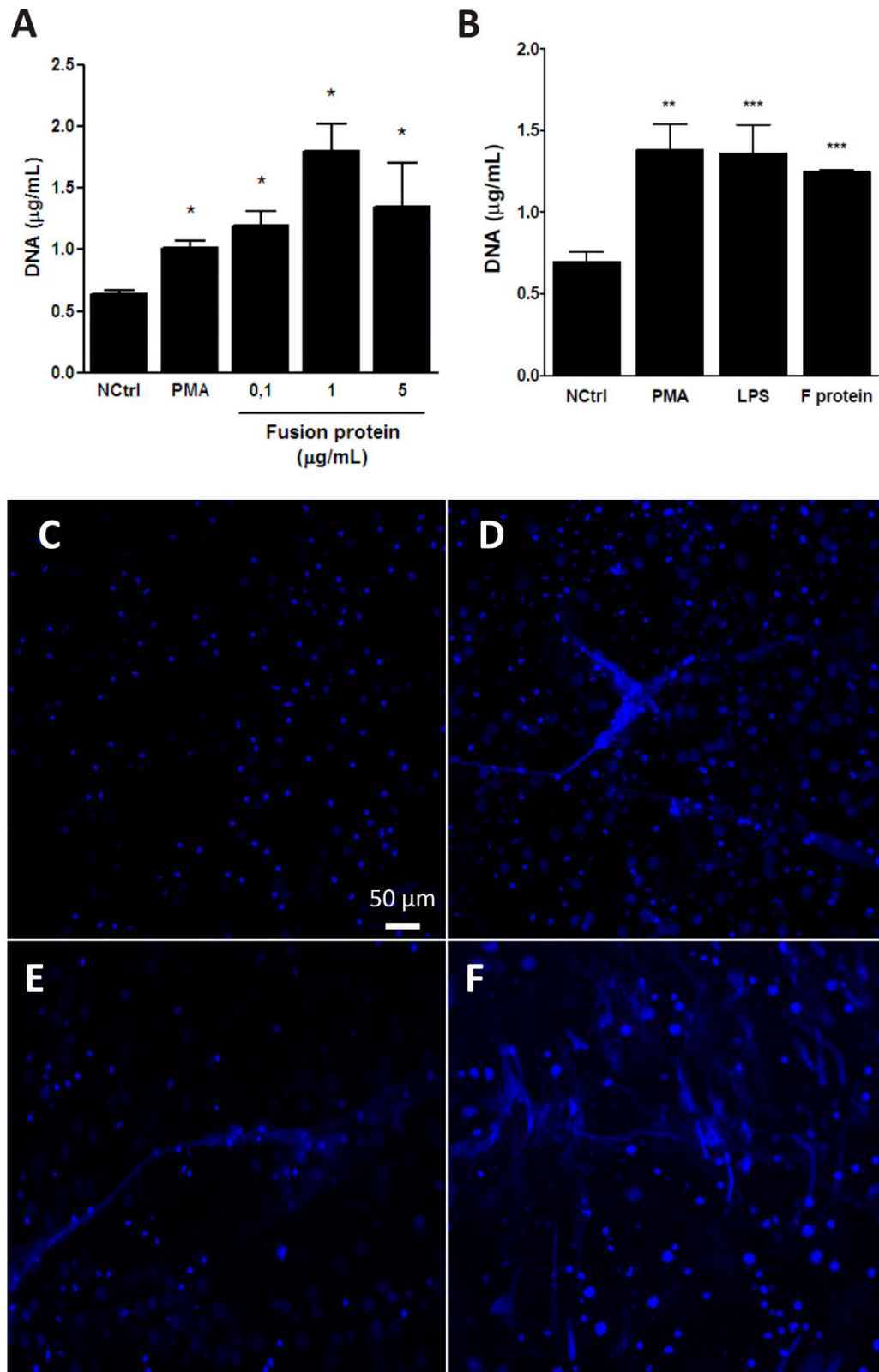


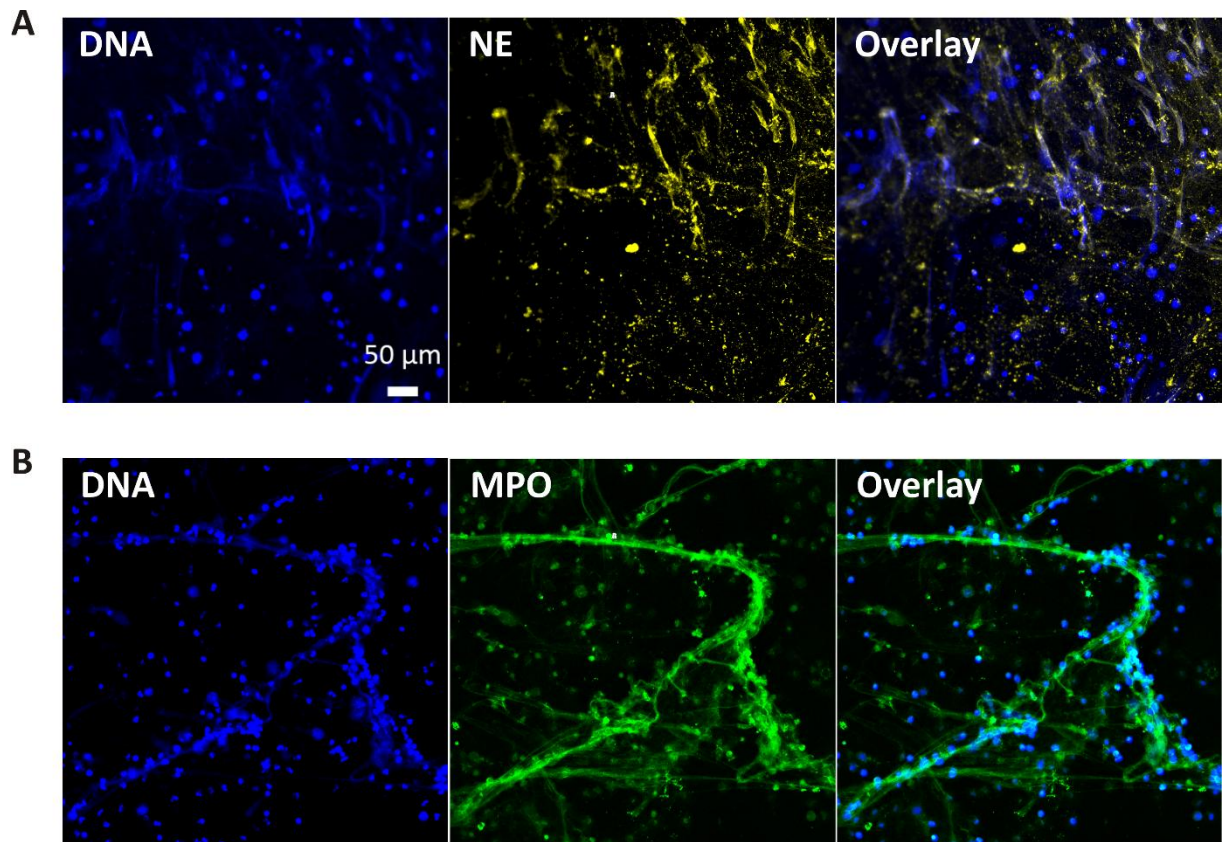
Figure 2:

Figure 3:

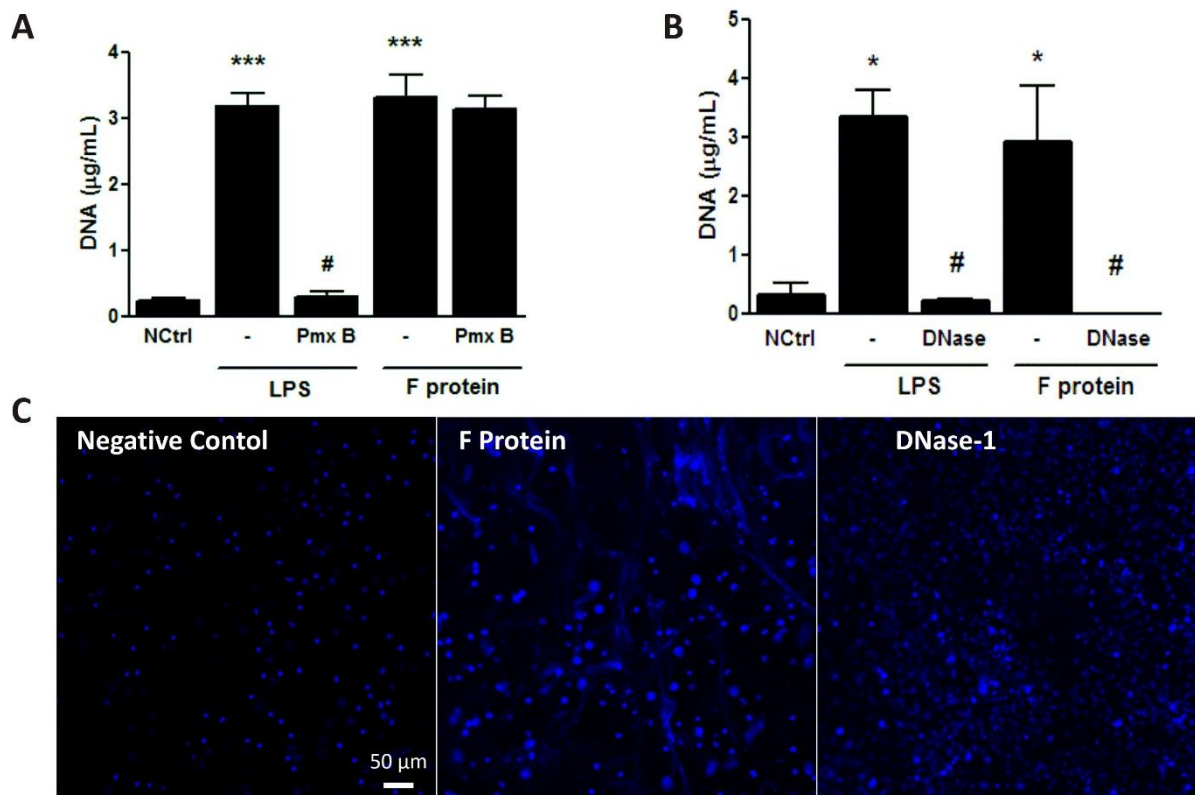


Figure 4:

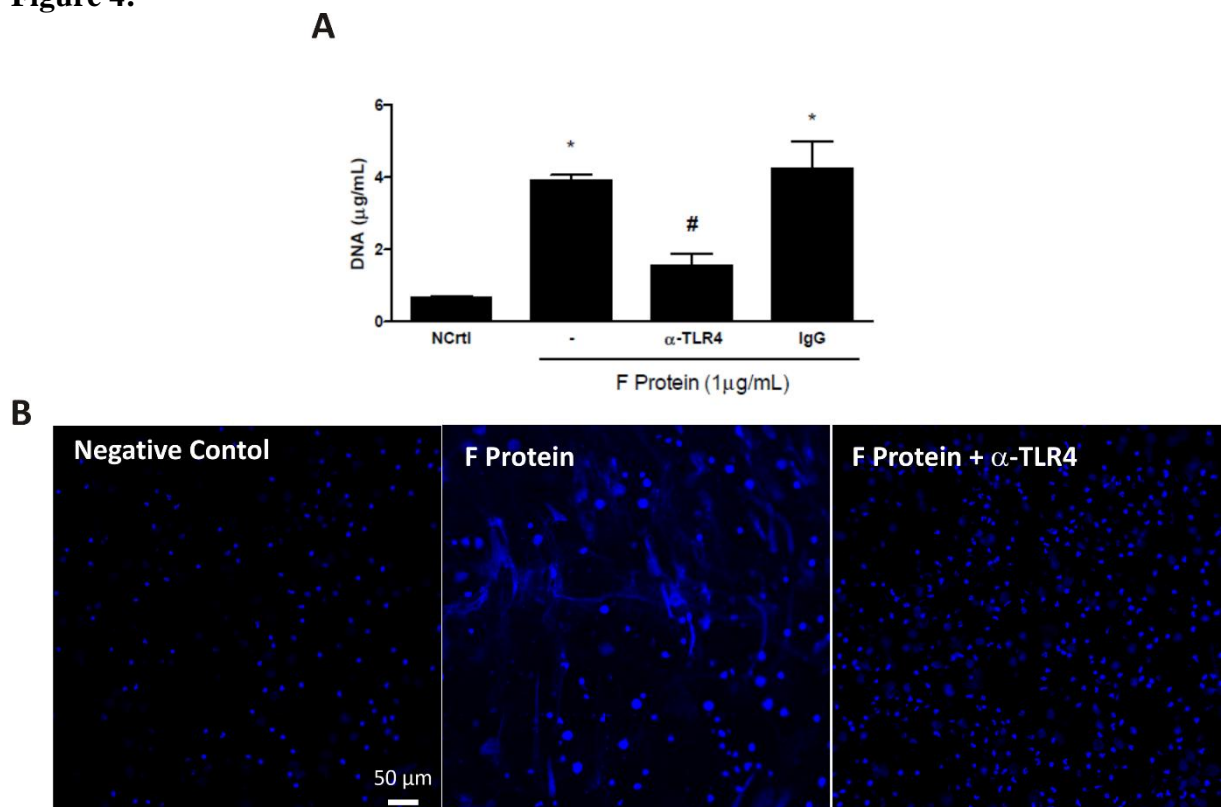


Figure 5:

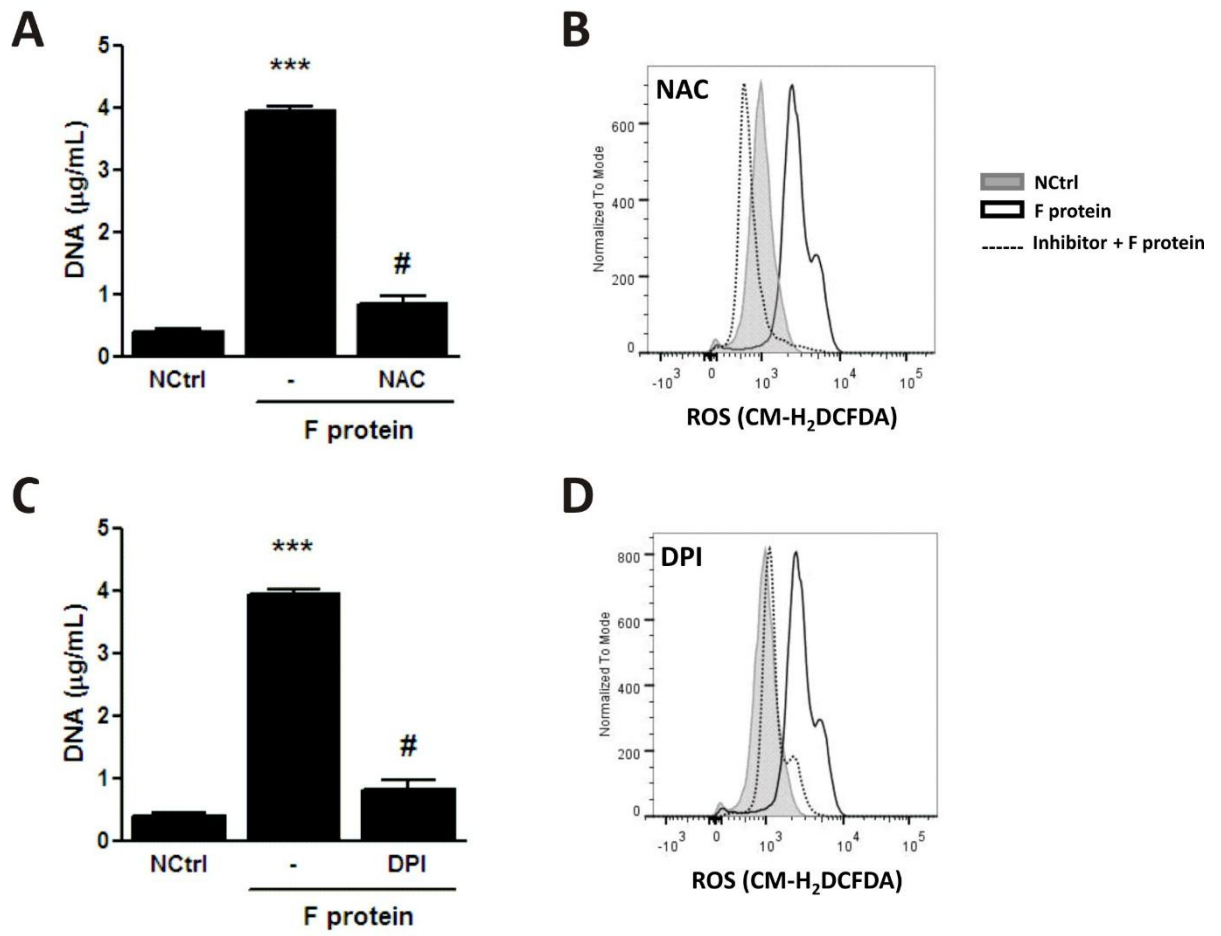
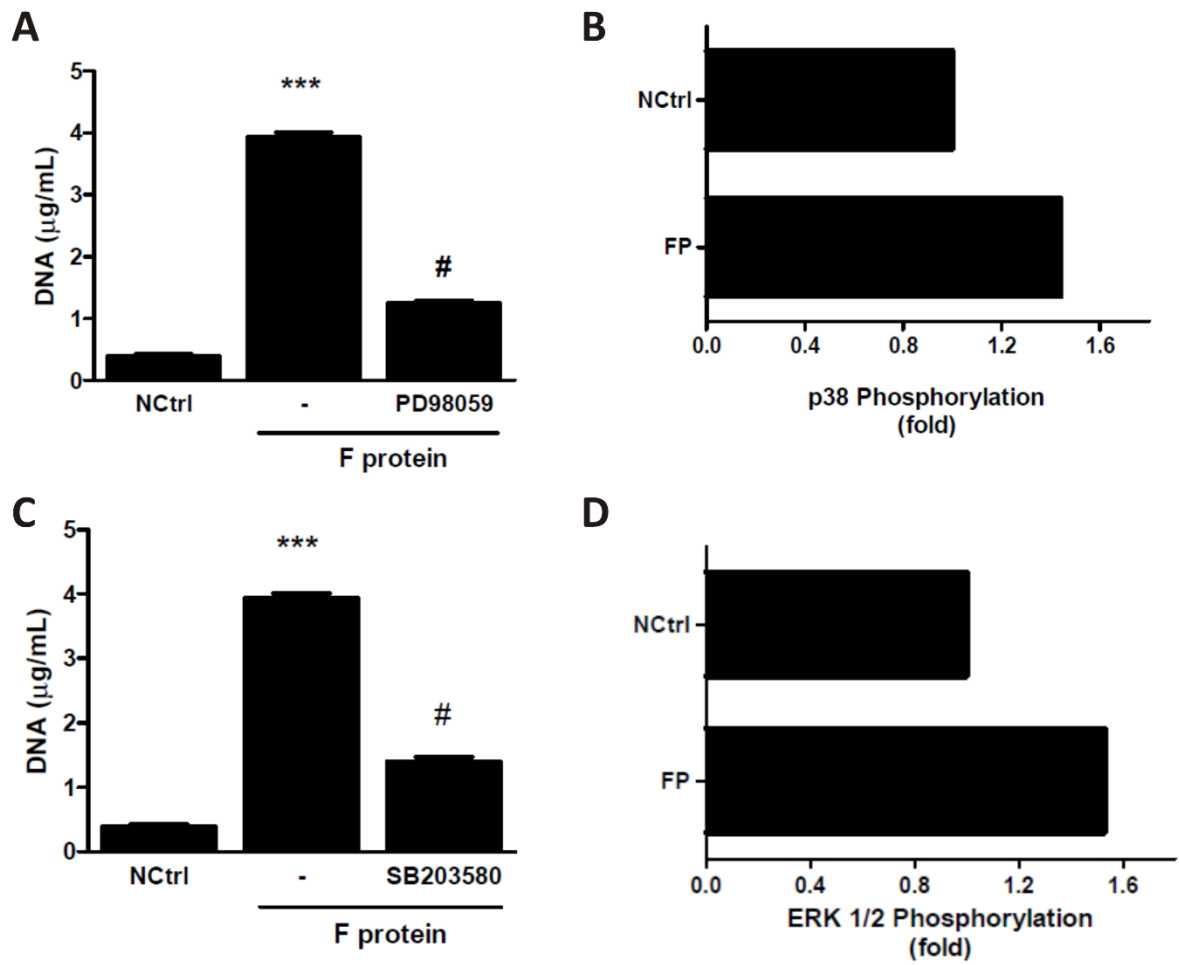


Figure 6:



Capítulo 3 – Considerações Finais

Neste estudo nós demonstramos que a Proteína F do RSV é capaz de induzir NETs em neutrófilos humanos. A contaminação da proteína F por endotoxinas foi descartada com o tratamento com Polimixina B, ou seja, a proteína F do RSV de fato estimula os neutrófilos a produzirem NETs. É possível notar que o estímulo da proteína F induz NETs semelhantes ao PMA e ao LPS, estímulos estes que são descritos na literatura indutores de NETs. As NETs apresentavam como componente principal o DNA, além de Mieloperoxidase e Elastase Neutrofílica que colocalizaram em alguns momentos com as estruturas de DNA extracelular. Pacientes com bronquiólite causada por RSV apresentam elevada quantidade de Elastase Neutrofílica no trato respiratório (28), elastase esta que é um dos componentes das NETs (39). A Elastase Neutrofílica pode estar relacionada à patofisiologia da inflamação pulmonar ou ao aumento da liberação de mediadores inflamatórios (28,57).

A proteína F do RSV além de participar da fusão do vírus, é importante para a ativação do sistema imune inato, estimulando através do complexo TLR4/CD14 (22). Demonstramos que a liberação das NETs pelos neutrófilos estimulados com proteína F ocorre via TLR4. Neutrófilos que tiveram seus receptores TLR4 inibidos não conseguiram produzir NETs tão eficientemente em resposta à proteína F, indicando assim que além do receptor TLR4, possivelmente há o envolvimento de outros co-receptores ou receptores na resposta neutrofílica frente à proteína F do RSV, sendo necessário estudos posteriores para identificar demais participantes nesta resposta. Nossos dados mostram que o TLR4 está relacionado com a produção das NETs e poderia ser um alvo terapêutico eficiente para a diminuição da inflamação em pacientes com bronquiólite causada por RSV.

Após a ativação do TLR4, há um aumento na produção de ROS pelos neutrófilos em resposta à PF. Foi demonstrado que a liberação das NETs depende da produção de ROS pelos neutrófilos em resposta à proteína F. Fuchs e colaboradores propuseram que a produção de ROS é uma etapa inicial para as NETs [22]. Então, nossos dados confirmam que a produção de NETs em resposta à proteína F do RSV é dependente de ROS e a inibição da NADPH oxidase ou o tratamento com antioxidante impede fortemente a formação das NETs independentemente da presença do estímulo (Proteína F).

Alguns estímulos podem induzir o aumento da produção de ROS nos neutrófilos, e uma consequente fosforilação das proteínas MAPK p38 e ERK promovendo a liberação das NETs (54,58). Este é o caso da Proteína F do RSV, que provoca aumento da produção de ROS intracelular nos neutrófilos e isso leva a fosforilação de p38 e ERK. O tratamento com inibidores destas MAPKs impediu parcialmente que as NETs fossem liberadas, corroborando com a ideia de que o mecanismo de indução das NETs ocorre via receptor TLR4. Torna-se evidente que proteína F do RSV liga-se ao receptor TLR4 ativando a NADPH oxidase e aumentando a produção de ROS, este aumento da produção de ROS leva a ativação das MAPKs p38 e ERK. Dados demonstram que a MAPK ERK possivelmente está envolvida na inibição da apoptose e favorecimento da NETosis (58).

Há pouca informação quanto à produção de NETs frente a uma infecção viral (32). Nossos dados tornam-se importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento do RSV. A produção excessiva de NETs nos pulmões de crianças infectadas com RSV pode aumentar a patologia pulmonar na infecção, uma vez que essas redes de DNA que contêm enzimas dos grânulos neutrofílicos aumentam o dano endotelial e dificultam a função pulmonar. Como dito anteriormente, há alguns estudos que demonstram um papel positivo das NETs frente a infecções virais, inativando e aprisionando as partículas virais e protegendo o hospedeiro (32,47,44). Mas há também na literatura dados que demonstram que um excesso de NETs no tecido pulmonar de hospedeiros infectados com vírus respiratórios pode estar relacionado com a injúria pulmonar durante a infecção viral (45,46). Estes dados abrem margem para posteriores estudos *in vivo* que possam averiguar se a presença das NETs tem um caráter somente protetor, ou há correlação entre grande liberação de NETs e piora do quadro do paciente infectado por RSV. Os neutrófilos tem um papel importante na imunopatologia durante a infecção causada por RSV quando são fortemente recrutados para o pulmão. Finalmente, nós propomos que o receptor TLR-4 possa ser utilizado como alvo para novas terapias, assim como o tratamento com DNase, visando controlar a grande reação inflamatória proveniente desta infecção.

4 Referências

1. CHERIAN, T. et al. Evaluation of simple clinical signs for the diagnosis of acute lower respiratory tract infection. **Lancet**, 1988. 125-8.
2. STEIN, R. Early-life viral bronchiolitis in the causal pathway of childhood asthma: is the evidence there yet? **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 178, n. 11, 2008. 1097.
3. MEJIAS, A. et al. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. **Pediatr Infect Dis J**, 24, 2005. 189–96. discussion S96–7.
4. BLOUNT, R. E.; JR, J. A.; JR MORRIS, R. E. S. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 92, n. 3, 1956. 544.
5. CHANOCK, R. M.; B. ROIZMAN, R. M. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): isolation, properties and characterization. **Am. J. Hyg.**, 66, n. 3, 1957. 281.
6. GARENNE, M.; RONSMANS, C.; CAMPBELL, H. The magnitude of mortality from acute respiratory. **World Health Stat. Q.**, 45, n. 2-3, 1992. 180.
7. BUENO, S. M. et al. Host immunity during RSV pathogenesis. **Int. Immunopharmacol.**, 8, 2008. 1320.
8. CHANG, J.; SRIKIATKHACHORN, A.; BRACIALE, T. J. Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8(+) T cells during experimental virus infection. **J Immunol**, 167, 2001. 4254–60.
9. BRACIALE, T. J. Respiratory syncytial virus and t cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. **Proc Am Thorac Soc**, 2, 2005. 141–6.
10. BRICKS, L. F. Prevention of respiratory syncytial virus infections. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**, 56, n. 3, 2001. 79.
11. Departamento de Informática do SUS - DATASUS. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/>>. Acesso em: 27 Agosto 2012.

12. BEZERRA, P. G. M. et al. Viral and Atypical Bacterial Detection in Acute Respiratory Infection in Children Under Five Years. **PLoS ONE**, 6, n. 4, 2011. e18928.
13. VIEIRA, S. E. et al. Clinical Patterns and Seasonal Trends in Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 43, 2001. 125-131.
14. PECCHINI, R. et al. Incidence and Clinical Characteristics of the Infection by the Respiratory Syncytial Virus in Children Admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 12, n. 6, 2008. 476-479.
15. OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatr. Respir. Rev.**, 5, n. Suppl. A, 2004. S119.
16. KIM, H. W. et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **Am. J. Epidemiol.**, 89, n. 4, 1969. 422-434.
17. WARIS, M. E. et al. 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.**, 70, 1996. 2852.
18. MOGHADDAM, A. et al. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. **Nat. Med.**, 12, n. 8, 2006. 905-907.
19. OPENSHAW, P. J.; TREGONING, J. S. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, 18, 2005. 541.
20. GROSKREUTZ, D. J. et al. Respiratory Syncytial Virus Induces TLR3 Protein and Protein Kinase R, Leading to Increased Double-Stranded RNA Responsiveness in Airway Epithelial Cells. **J. Immunol.**, 176, 2006. 1733.
21. LIU, P. et al. Retinoic Acid-Inducible Gene I Mediates Early Antiviral Response and Toll-Like Receptor 3 Expression in Respiratory Syncytial Virus-Infected Airway Epithelial Cells. **J. Virol.**, 81, 2007. 1401.

22. KURT-JONES, E. A. et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nat. Immunol.**, 1, 2000. 398.
23. RALLABHANDI, P. et al. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein-Induced Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signaling Is Inhibited by the TLR4 Antagonists Rhodobacter sphaeroides Lipopolysaccharide and Eritoran (E5564) and Requires Direct Interaction with MD-2. **mBio**, 2012.
24. BENNETT, B. L. et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. **J. Infect. Dis.**, 195, 2007. 1532.
25. OLSZEWSKA-PAZDRAK, B. et al. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 α by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. **J. Virol.**, 72, 1998. 4756.
26. TERAN, L. M. et al. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155, 1997. 1362.
27. VAN SCHAIK, S. Respiratory syncytial virus affects pulmonary function in BALB/c mice. **J. Infect. Dis.**, 177, 1998. 269.
28. EMBORIADOU, M. et al. Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, 37, 2007. 79.
29. ARNOLD, R.; KÖNIG, W. Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively Intercellular Adhesion Molecule-1 expression. **J. Immunol.**, 174, 2005. 7359.
30. RZEPKA, J. P.; HAICK, A. K.; MIURA, T. A. Virus-Infected Alveolar Epithelial Cells Direct Neutrophil Chemotaxis and Inhibit Their Apoptosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 46, 2012. 833–841.
31. JAOVISIDHA, P. et al. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. **J. Immunol**, 163, 1999. 2816.

32. JENNE, C. N. et al. Neutrophils Recruited to Sites Of Infection Protect From Virus Challenge By Releasing Neutrophil Extracellular Traps. **Cell Host & Microbe**, n. 13, Fevereiro 2013. 169-180.
33. XU, T. et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Avian Influenza A (H5N1) Virus in Mice. **Am J Respir Crit Care Med**, 174, 2006. 1011–1017.
34. DENG, G. et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by H9N2 Virus in Mice. **Arch Virol**, n. 155, 2010. 187–195.
35. PERRONE, L. et al. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. **PLoS Pathogens**, 4, 2008.
36. GUNZER, M. Traps and Hyper Inflammation – New Ways That Neutrophils Promote or Hinder Survival. **British Journal Of Haematology**, 2013.
37. BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **SCIENCE**, 303, 2004.
38. URBAN, C. F. et al. Neutrophil Extracellular Traps Capture and Kill *Candida albicans* Yeast and Hyphal Forms. **Cellular Microbiology**, 2006.
39. URBAN, C. et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, 2009.
40. WARTHA, F. et al. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, 2007. 52–56.
41. CLARK, S. et al. Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood. **NATURE MEDICINE**, 13, 2007.
42. GUIMARÃES-COSTA, A. et al. *Leishmania amazonensis* Promastigotes Induce and Are Killed by Neutrophil Extracellular Traps. **PNAS**, 106, 2009.
43. MCCORMICK, A. et al. NETs Formed by Human Neutrophils Inhibit Growth of the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. **Microbes and Infection**, 12, 2010. 928-936.

44. WARDINI, A. et al. Characterization of Neutrophil Extracellular Traps in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus. **Journal of General Virology**, 2010.
45. NARASARAJU, T. et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. **The American Journal of Pathology**, 2011.
46. HAMAGUCHI, S. et al. Case of Invasive Nontypable Haemophilus Influenzae Respiratory Tract Infection with a Large Quantity of Neutrophil Extracellular Traps in Sputum. **Journal of Inflammation Research**, 2012.
47. SAITOH, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host Microbe**, 2012.
48. FUCHS, T. A. et al. Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal Of Cell Biology**, 2007. 213-241.
49. GUIMARÃES-COSTA, A. et al. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. **Journal of Parasitology Research**, 2011.
50. NEELI, I. et al. Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils. **Journal of Innate Immunology**, 2009.
51. ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) — Formation and Implications. **ACTA Biochimica Polonica**, 2013.
52. ALMYROUDIS, N. et al. NETosis and NADPH oxidase: at the Intersection of Host Defense, Inflammation and Injury. **Frontiers in Immunology**, 2013.
53. BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial Suicide: Why Neutrophils Die to Make NETs. **Nature**, 2007.
54. KESHARI, R. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of ERK and p38 MAPK Mediates PMA-Induced NETs Release from Human Neutrophils. **J. Cell. Biochem.**, 2013.

55. YOUSEFI, S. et al. Viable Neutrophils Release Mitochondrial DNA to Form Neutrophil Extracellular Traps. **Cell Death and Differentiation**, 2009.
56. TADIE, J. et al. HMGB1 Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation Through Interactions with Toll-like Receptor 4. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2013.
57. KAWABATA, K.; HAGIO, T.; MATSUOKA, S. The Role of Neutrophil Elastase in Acute Lung Injury. **European Journal of Pharmacology**, 2002.
58. HAKKIM, A. et al. Activation of the Raf-MEK-ERK Pathway is Required for Neutrophil Extracellular Trap Formation. **nature CHEMICAL BIOLOGY**, 2011.
59. KUIJPERS, T. W.; ROOS, D. Neutrophils: the power within. In: KAUFMANN, S. H. E.; MEDZHITOV, R.; GORDON, S. **The innate immune response to infection**. [S.l.]: [s.n.], 2004. p. 47.
60. **Tree of Life Web Project**. Disponivel em: <http://tolweb.org/Single-stranded_Negative_Sense_RNA_Viruses/21834/2006.02.05>. Acesso em: 03 maio 2012. Version 05 February 2006.

ANEXO A – Demais Produções do Mestrado

1. A apoptose de neutrófilos e a Bronquiolite Viral Aguda

Uma vez ativados, os neutrófilos são capazes de fagocitar, de liberar enzimas líticas de seus grânulos e peptídeos antimicrobianos dentro do fagolisossomo e de gerar grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como espécies reativas de nitrogênio (59). Sob condições fisiológicas, os neutrófilos têm uma meia-vida curta, sendo comprometidos com apoptose. Agentes que promovem a responsividade de neutrófilos, como LPS, podem retardar a apoptose destes. A sobrevivida prolongada pode aumentar a patologia pulmonar em crianças com bronquiolite por RSV.

2. Objetivos

Investigar o efeito da proteína F do RSV sobre a inibição da apoptose de neutrófilos humanos.

3. Métodos

Neutrófilos humanos (5×10^6 /mL) foram estimulados com a proteína F (1 μ g/mL), LPS (100ng/mL), IL-8 (100nM) ou somente meio por 18h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células foram citocentrifugadas, fixadas e coradas com o kit Panótico Rápido e contadas em microscópio óptico para determinar a proporção de células com características apoptóticas. Alternativamente, para medir a exposição de fosfatidilserina na superfície dos neutrófilos e assim identificar as células em apoptose, o ensaio de ligação à Anexina V foi realizado. Para isso utilizou-se um kit Annexin V FITC Assay Kit (Cayman).

4. Resultados Parciais

Com a medida da apoptose de neutrófilos através da morfologia celular em cultura (Fig. 1) foi possível padronizar a técnica utilizando dois estímulos anti-apoptóticos de neutrófilos conhecidos, o LPS e a IL-8.

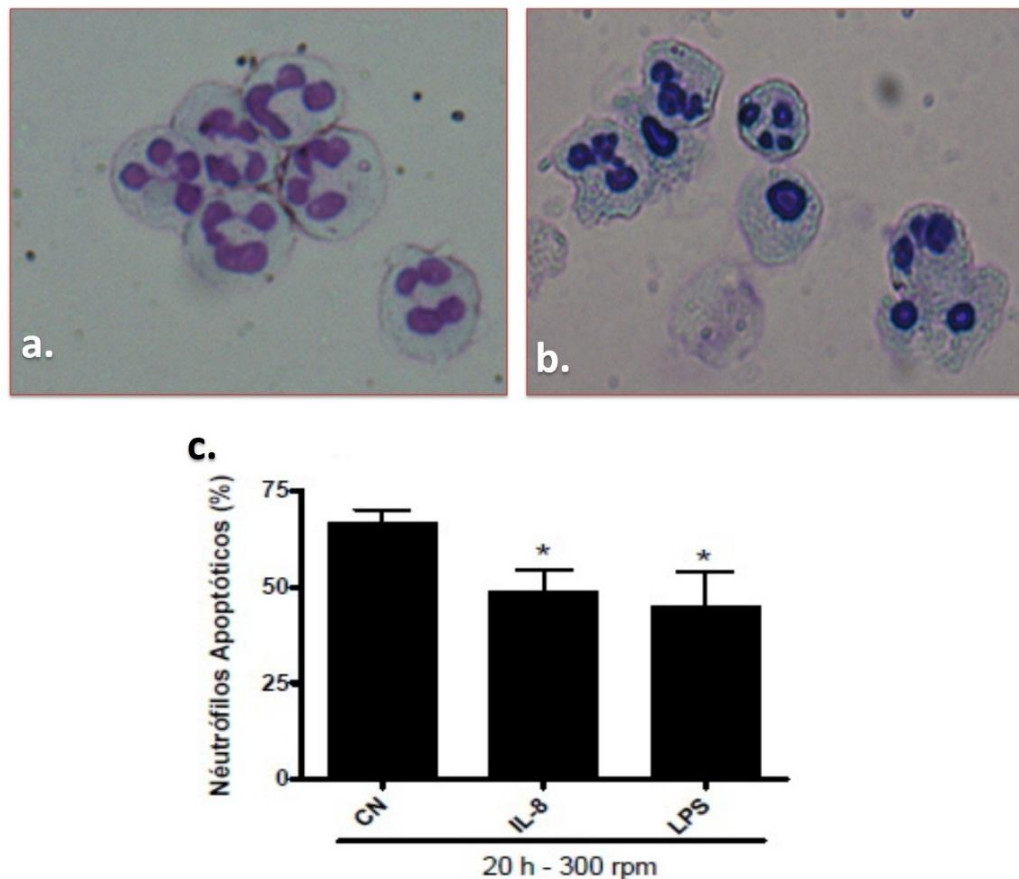


Figura 1. Medida da apoptose de neutrófilos em cultura. Neutrófilos foram isolados de pacientes saudáveis utilizando-se de gradiente de Ficoll. Posteriormente, foram estimulados com LPS (100ng/mL) ou IL-8 (100nM). Após 20h as células foram citocentrifugadas, fixadas e coradas. Através da análise da morfologia dos neutrófilos, diferenciando-os em neutrófilos não-apoptóticos (a) e neutrófilos apoptóticos (b), a contagem das células pode ser realizada através de um microscópio óptico. Verificou-se que as células estimuladas com LPS e IL-8 diminuíram a porcentagem de apoptose (c). Confirmando dados que já existem na literatura, onde LPS e IL-8 estão envolvidos no retardamento da apoptose de neutrófilos. * $P < 0,05$ comparados com controle.

A medida da apoptose através de citometria de fluxo (Fig. 2) utilizando-se kit Anexina V também foi padronizada. Interessantemente as duas metodologias utilizadas para padronizar a técnica de medição da apoptose apresentaram resultados semelhantes.

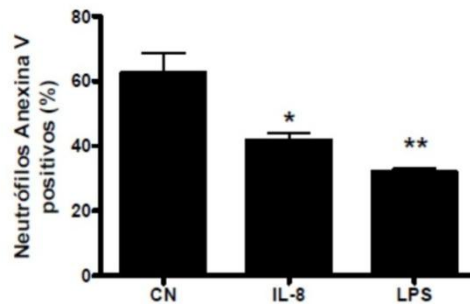


Figura 2. Diminuição do percentual de neutrófilos apoptóticos quando tratados com IL-8 e LPS. Para medir a exposição de fosfatidilserina na superfície dos neutrófilos e assim identificar as células em apoptose, o ensaio de ligação à Anexina V foi realizado. Para isso utilizou-se um kit Annexin V FITC Assay Kit (Cayman). Os neutrófilos foram estimulados por 20h com LPS (100ng/mL) ou IL-8 (100nM). Quantificação de neutrófilos apoptóticos foi realizada através de citometria de fluxo. Quando positivos para Annexin V, os neutrófilos encontram-se em apoptose. *P<0,05 comparado com controle, **P<0,01 comparado com controle.

Posteriormente, foi realizada a análise do efeito da proteína F sobre a apoptose dos neutrófilos (Fig. 3). Verificou-se que a proteína F têm um efeito sobre a apoptose destas células, sendo que na presença de 1µg/mL de proteína F do RSV o percentual de neutrófilos apoptóticos diminuiu.

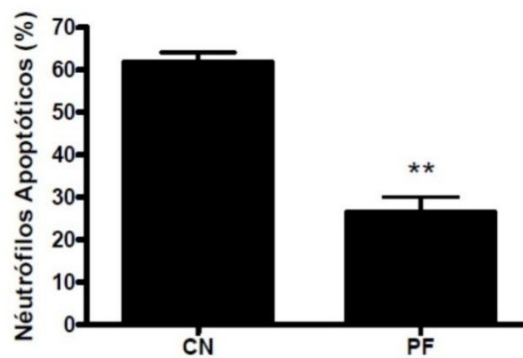


Figura 3.: A proteína F do RSV está envolvida na diminuição da apoptose de neutrófilos. Neutrófilos foram isolados de pacientes saudáveis utilizando-se de gradiente de Ficoll. Posteriormente, foram estimulados com Proteína F do RSV (1µg/mL). Após 18h as células foram citocentrifugadas, fixadas e coradas e a contagem das células foi realizada utilizando um microscópio óptico. A proteína F diminuiu significadamente a porcentagem de neutrófilos apoptóticos. *P<0,01 comparados com controle.

ANEXO B



gi funchal <gifunchal@gmail.com>

14-00693-FL Approved MS Receive

infoji@aai.org <infoji@aai.org>
To: gifunchal@gmail.com

Fri, Mar 14, 2014 at 9:59 AM

CC: Dr. Porto

Dear Dr. Funchal:

This e-mail is to notify you that you are listed as a co-author on a manuscript, titled "Respiratory Syncytial Virus Fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils," submitted by Dr. Porto for consideration for publication in The Journal of Immunology. The manuscript has been assigned the manuscript identification number 14-00693-FL.

Regards,

Journal Staff
The Journal of Immunology