CLAUDIA TRIGO PEDROSO DE MORAES SALES

**DETECÇÃO DE QUASISPECIES EM AMOSTRAS DE
VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL HUMANO (HRSV)
NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SOROS
POLICLONAIS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

São Paulo

2009

RESUMO

de Moraes, CTP. Detecção de quasispecies em amostras de vírus respiratório sincicial humano (HRSV) na ausência e na presença de soros policlonais [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O vírus respiratório sincicial humano (HRSV) é um agente patogênico respiratório de grande importância clínica, tendo em vista que acomete cerca de 64 milhões de crianças com idade entre zero e cinco anos por ano em todo o mundo causando doenças como bronquiolite e pneumonia, podendo levar à morte. Hoje em dia a prevenção é possível por meio da imunoterapia, mas não há uma vacina eficaz contra o vírus. Isto se deve a uma série de fatores, dentre eles a resposta imune do hospedeiro e a variabilidade genética do HRSV. Outro fator que pode interferir na produção de uma vacina é a presença de quasispecies na população viral. As quasispecies são formadas por sequências em minoria em uma população dominante e se distribuem de uma maneira organizada, funcionando como a memória do vírus. Sequências menos frequentes podem tornar-se dominantes na população em consequência da pressão seletiva. Neste trabalho o objetivo foi detectar quasispecies virais em amostras clínicas e verificar se soros obtidos da criança na fase convalescente da doença e de sua respectiva mãe selecionavam estes mutantes. Uma alteração não-sinonima no peptídeo sinal do gene F do HRSV foi encontrada em um dos clones sequenciados. Quatro mutações foram encontradas em sequências da região G2 de clones do HRSV na ausência de anticorpos de neutralização, sendo duas sinonimas e duas não-sinonimas, sendo as últimas no mesmo nucleotídeo. Uma alteração não-sinonima no gene F do HRSV foi encontrada em um dos clones sequenciados. Uma alteração não-sinonima foi encontrada no gene G do HRSV em presença de soro policlonal humano, coletado da criança na fase convalescente. Esta alteração ocorreu em um clone proveniente da mesma amostra, a qual foram observadas alterações não-sinonimas e foi idêntica às duas mutações não-sinonimas verificadas na ausência de anticorpos policlonais humanos. Sendo assim, sequências em menor quantidade presentes na população viral podem ser selecionadas pelo sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo para mecanismos evolutivos do HRSV.

Palavras-Chave: Vírus respiratório sincicial humano. Quasispecies. Proteína G. Proteína F. Soro Policlonal Humano.

ABSTRACT

de Moraes, CTP. Quasispecies detection in human respiratory syncytial virus (HRSV) samples in absence and presence of polyclonal serum [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is one of the most important clinical respiratory pathogens, since 64 millions children between 0 and 5 years old are infected by this agent every year and can develop bronchiolitis and pneumonia and died. Nowadays prevention is possible by immunotherapy, but it doesn't have an effective vaccine available. Host immunity and viral genetic variability are important factors to development a vaccine. Besides, viral quasispecies is another factor that difficult vaccine production. Quasispecies are formed by the dynamic between master and minority sequences distributed in an organized form inside viral population, that work like a viral memory. Low frequently sequences can become dominant in presence of selective pressure. In this work HRSV quasispecies were detected in clinical samples in absence and presence of human polyclonal serum collected by children in the convalescent phase and mother serum. A non-synonymy variation was found in the F gene in neutralization antibodies absence. Four mutations were found at HRSV G gene in polyclonal serum absence. Two were synonymy and two were non-synonymy variation, the last in the same nucleotide. A non-synonymy mutation was found in the G gene in presence of polyclonal serum collected from child convalescent phase. This alteration was the same of the observed in absence of polyclonal serum. In conclusion it is possible that minority sequences are selected by host antibodies contributing for HRSV evolution process.

Key words: Human Respiratory Syncytial virus. Quasispecies. G protein. F protein. Human polyclonal serum.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O vírus respiratório sincicial (*respiratory syncytial virus*, RSV) foi isolado pela primeira vez de um chimpanzé, e a princípio, o agente patogênico foi denominado *chimpanzee coryza agent* (CCA). Os pesquisadores examinaram toda a colônia de chimpanzés e constataram que 100% deles estavam infectados (Morris et al., 1956). Humanos que haviam estado em contato com os animais também exibiam doença de trato respiratório médio e coriza, embora o quadro clínico fosse menos severo do que nos chimpanzés. Posteriormente, o mesmo vírus foi diagnosticado em crianças hospitalizadas nos Estados Unidos (Baltimore-Maryland), que apresentavam infecção no trato respiratório (Chanock et al., 1957), tendo sido denominado vírus respiratório sincicial humano (*Human respiratory syncytial virus* - HRSV) devido à formação característica de sincícios em culturas celulares (Collins et al., 2001; McIntosh e Chanock, 1990). Os dois principais vírus isolados de pacientes com doença no trato respiratório superior foram a amostra *Long*, comumente utilizada em laboratórios nos dias de hoje, isolado de uma criança com broncopneumonia, e a amostra *Schneider*, colhida de uma criança com crupe (Chanock et al., 1957; Chanock e Finberg, 1957). Estudos sorológicos realizados após o isolamento do vírus demonstraram que a maioria das crianças residentes em Baltimore havia sido infectada pelo vírus antes dos quatro anos de idade (Collins et al., 2001).

No Brasil, o HRSV foi detectado pela primeira vez por Candeias em 1964 em amostras de quatro crianças hospitalizadas com quadro respiratório agudo. Após o cultivo em células, a positividade para o HRSV foi confirmada pelo método de neutralização utilizando soro padrão (Candeias, 1967). Posteriormente, um estudo realizado com amostras colhidas de nasofaringe de crianças menores de cinco anos, no período de 1982 a 1985, no Rio de Janeiro, demonstrou que o HRSV foi o agente mais frequentemente associado aos casos mais graves de doenças do trato respiratório e que o vírus possuía um padrão de circulação sazonal, com pico nos meses de inverno (Nascimento et al., 1991).

Atualmente, o HRSV é mundialmente considerado o agente viral causador de doenças do trato respiratório de maior importância pediátrica, tendo em vista que crianças de até um ano de idade podem desenvolver pneumonia e bronquiolite quando infectadas pelo vírus (Collins e Crowe Jr, 2007). Embora a maioria da população tenha a primeira infecção antes de dois anos de idade, reinfecções pelo HRSV ao longo da vida são comuns, sendo que em crianças maiores e em adultos, os sintomas clínicos apresentam natureza mais branda (Hall et

al., 2001). Idosos e indivíduos imunossuprimidos, como por exemplo, transplantados de medula óssea, podem apresentar a forma grave da doença (Collins e Crowe Jr, 2007).

A doença aguda do trato respiratório por agentes infecciosos é uma das principais causas de morte no mundo e o HRSV continua sendo um dos principais patógenos envolvidos nesta problemática, principalmente em crianças menores de 1 ano, tendo em vista que ainda não há uma vacina eficaz contra este vírus (Collins e Crowe Jr, 2007)

O HRSV é classificado na Ordem *Mononegavirales*, Família *Paramyxoviridae*, Subfamília *Pneumovirinae* e Gênero *Pneumovirus* (Mackie, 2003; Van Regenmortel et al., 2000; ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2008). Existem espécies de vírus que acometem animais e são agrupadas neste gênero, tais como BRSV (bovine *respiratory syncytial virus*), que causa doença respiratória em bovinos, e o PMV (*pneumonia virus of mice*), que causa doença em camundongos (Collins e Graham, 2008). O RSV também pode causar doenças em ovinos (Mallipeddi et al., 1993) e caprinos (Cristina et al., 1998). No entanto, não foram descritos até o momento reservatórios animais do vírus humano, sugerindo que possivelmente ocorram *saltos* durante o processo evolutivo do vírus (Collins e Graham, 2008).

O vírion é composto por um nucleocapsídeo de simetria helicoidal envolvido por envelope lipídico, que se origina na membrana plasmática da célula hospedeira. O vírus é pleomórfico, sendo o diâmetro do vírion variável entre 150 a 300 nm (Collins et al., 2001; McIntosh e Chanock, 1990). Em culturas celulares pode haver uma grande quantidade de formas filamentosas, as quais podem variar entre 60 a 100 nm, quanto ao diâmetro, e chegar a 10 µm de comprimento. Cada partícula infecciosa contém apenas uma cópia funcional do genoma (Collins et al., 2001). Os estudos do HRSV são dificultados devido à “modesta” produção de vírus em culturas celulares e à instabilidade das partículas, associada principalmente às glicoproteínas de superfície (Collins e Graham, 2008). Além disso, as estruturas protéicas secundárias, terciárias e quaternárias do HRSV são sensíveis às alterações de pH e temperatura. As partículas virais são mais estáveis até a temperatura de 37°C e em pH 7. A labilidade e a heterogeneidade no tamanho da partícula representam obstáculos para a caracterização e formulação de uma vacina estável (Ausar et al., 2005).

O genoma viral é constituído por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), não segmentada e de polaridade negativa (-ssRNA) (McIntosh e Chanock, 1990). Os 15.222 nucleotídeos transcrevem dez RNAs mensageiros (RNAm) (Huang e Wertz, 1982) os quais são traduzidos em 11 proteínas diferentes, devido à segunda ORF (*open reading frame*)

localizada na região M2 (Teng et al., 2001). As proteínas N (*nucleoprotein*), P (*phosphoprotein*), L (*large polymerase*) e M2-1 estão associadas ao nucleocapsídeo, sendo que as três primeiras são necessárias e suficientes para a replicação do RNA e sozinhas têm atividade transcriptase. Entretanto, a proteína M2-1 é fundamental para que o processo de transcrição seja completo. Duas proteínas, designadas como NS1 e NS2, são não estruturais (Collins e Crowe Jr, 2007) e apresentam-se em abundância nas células infectadas, embora sejam encontradas em poucas quantidades nos vírions (Collins et al., 1996), tendo como função a indução e a sinalização de interferons (IFN) e inibição de apoptose. A proteína regulatória M2-2 é responsável pelo controle do balanço entre a transcrição e replicação de RNA (Collins e Crowe, 2007; Collins e Graham, 2008) sendo expressa em baixos níveis intracelularmente (Ahmadian et al., 1999; Collins e Crowe, 2007). A proteína M (*matrix*) delimita a superfície interna do envelope e é importante para manutenção da morfogênese viral. As proteínas SH (*small hydrofobic protein*), G (adesão) e F (fusão) são transmembranas, glicosiladas e se localizam na superfície viral. O papel da proteína SH em relação à infecção ainda não foi bem esclarecido (Collins e Crowe Jr, 2007), enquanto G e F são as principais proteínas envolvidas no processo infeccioso e que induzem anticorpos de neutralização (Collins e Graham, 2008).

A proteína G é responsável pela ligação do vírus ao receptor celular (Levine et al., 1987), que consiste em moléculas da classe das glicosaminoglicanas (GAGs) como o heparano sulfato e a condroitina B presentes na superfície da célula (Hallak et al., 2000). Já a proteína F é responsável pela penetração (Collins e Crowe Jr, 2007) e pela fusão da membrana viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (Walsh e Hruska, 1983). A proteína F também é responsável pela fusão de uma célula infectada à outra, promovendo a formação de sincícios (Walsh et al., 1985). A proteína G foi identificada como a principal proteína de adesão do vírus à célula, tendo em vista que anticorpos anti-G inibem a entrada viral enquanto anticorpos anti-F não impedem a entrada do vírus, mas inibem o processo de fusão (Collins e Crowe Jr, 2007). A proteína SH não tem sua função bem conhecida, mas parece estar relacionada à inibição de sinalização do fator de necrose tumoral (FNT α), já que mutantes com deleção no gene SH (RSV Δ SH) apresentam mais sincícios em células de epitélio alveolar humano A549 do que os vírus selvagens (Fuentes et al., 2007). Também parece funcionar como um canal iônico formador de viroporinas, que desempenha um importante papel na montagem e liberação de partículas virais tal como na patogenicidade e citotoxicidade (Kochva et al., 2003). Embora as proteínas F, G e SH tenham suas funções

particulares, a formação de sincícios *in vitro* é mais eficiente quando há coexpressão das três proteínas de superfície do que quando apenas a proteína F é expressa (Heminway et al., 1994). Aparentemente isto ocorre porque estas três proteínas juntas formam um complexo heteroligomérico que aumenta afinidade pelo heparano sulfato, favorecendo a dispersão viral pelo processo de fusão célula-célula *in vitro* (Feldman et al., 2001). Em outro estudo, no entanto, foi observada apenas interação entre F e G com a superfície de células infectadas, sugerindo que a proteína G tenha um papel indireto na fusão do vírus à célula (Low et al., 2008).

A proteína G (Figuras 1 e 2) é uma glicoproteína transmembrana do tipo II, ou seja, está ancorada à membrana próxima a sua porção amino-terminal (N-terminal) por um único sítio hidrofóbico localizado entre os aminoácidos 38 a 66, no qual existe um peptídeo sinal, que não é clivado. HRSV mutantes que apresentam deleção destes resíduos não são glicosilados, nem expressos na membrana celular e tão pouco são secretados, demonstrando a necessidade destes aminoácidos para ancoragem do vírus à células (Lichtenstein et al., 1996). A forma solúvel (Gs) é expressa após a tradução do segundo códon AUG localizado no aminoácido 48 (Met 48) da ORF presente na região do sinal de ancoragem. O processo é seguido pela clivagem proteolítica até a remoção de 65 aminoácidos da região N-terminal, incluindo o sinal de ancoragem (Collins e Crowe Jr, 2007; Roberts, 1994). A Gs totaliza cerca de 20% do total de expressão da proteína G em células infectadas por HRSV *in vitro*, sendo que por ser secretada rapidamente, 80% é liberado na cultura celular em 24 horas e o restante permanece associado ao virion (Collins e Crowe Jr, 2007). Tanto a forma ancorada à membrana (Gm), quanto à forma Gs são produzidas em células epiteliais de pulmão (Arnold et al., 2004). A função biológica da Gs no ciclo do vírus ainda é desconhecida, mas parece estar relacionada com a imunopatologia nas infecções (Graham et al., 2000) tendo em vista que é a principal forma da proteína G apresentada precocemente ao sistema imune após a infecção (Martínez et al., 1997). A diminuição da Gs aumenta a resposta pro inflamatória em células A549, já que dessa forma ocorre ao aumento da expressão de moléculas de adesão intracelulares tipo 1 (ICAM-1) na célula, tal como de interleucina 8 (IL-8) e regulação da ativação de expressão e secreção de linfócitos T normais (RANTES) após 20 horas de infecção. Além disso, o mutante apresenta maior atividade de ligação ao Fator Nuclear kB (FN-kB) e replica-se de forma menos eficiente em células A549 do que o vírus selvagem. Esses dados sugerem que a redução da produção de Gs ocorre em detrimento à resposta imune inflamatória que ocorre no pulmão. Sendo assim, o HRSV poderia reduzir a inflamação em

células pulmonares aumentando a produção de Gs, e com isso, esta forma da proteína podeira conferir vantagens ao vírus (Arnold et al., 2004).

O total de aminoácidos que formam a proteína G varia entre 292 e 319 nucleotídeos dependendo da amostra. A síntese da proteína inicia-se com um precursor polipeptídico de 32 kDa que é extensivamente por ligações dos tipos N e O. A glicosilação é do tipo O quando a ligação ocorre entre glicídios e o oxigênio (O) presente nos aminoácidos, presente principalmente nos aminoácidos serina (Ser) e treonina (Thr) e a glicosilação do tipo N ocorre quando a molécula de açúcar se liga ao nitrogênio presente na asparagina (Asn) (Johnson, et al., 1987; Wertz et al., 1985). As cadeias pesadas de manose de ligações do tipo N são adicionadas concomitantemente a tradução do precursor, gerando um peptídeo intermediário de 45 a 50 kDa. Esse passo é seguido por uma conversão de açúcares de ligação do tipo N para açúcares de ligação do tipo O. Essa conversão ocorre no complexo de Golgi e leva a formação de um peptídeo de 80 a 90 kDa (Martínez et al., 1997; Melero et al., 1997). A proteína é ainda palmitilada, possivelmente em um único resíduo de cisteína localizado na cauda citoplasmática na porção N-terminal (Collins e Mottet, 1992).

A proteína G possui um ectodomínio carboxila-terminal (C-terminal) que contém alto teor de Ser e Thr, sítios potenciais para glicosilação tipo O, sendo sua composição semelhante à de aminoácidos das mucinas, uma classe de proteínas produzida e secretada por células epiteliais (Martínez et al., 1997; Melero et al., 1997). A infectividade do HRSV é sensível à remoção das ligações do tipo N e do tipo O dos oligossacarídeos por endoglicosidases, indicando a necessidade desses carboidratos para que a glicoproteína G desempenhe sua função (Lambert, 1988; Melero et al., 1997). Alterações na glicosilação do domínio C-terminal da proteína diminuem a reatividade com soros humanos, indicando que a esta variação pode contribuir para a evasão do sistema imunológico humoral pelo HRSV (Rawling e Melero, 2007).

A região central do ectodomínio externo (aminoácidos 164 a 176) e quatro resíduos de cisteína (aminoácidos 173, 176, 182 e 186) são conservados dentre os isolados de HRSV (Sanz et al., 1994; Collins e Crowe Jr, 2007). Aparentemente o domínio conservado não é necessário para a eficiência da infecção *in vivo* e *in vitro* (Teng et al., 2001; Teng e2, 2002). Os resíduos de cisteína são ligados por pontes dissulfídicas entre os aminoácidos 173-186 e 176-182 (Rueda et al., 1994). Acredita-se que o segmento formado pelos aminoácidos 183 a 197 seja responsável pela ligação do vírus ao receptor celular e pelo início do disparo da respostas imunológicas humoral e celular (Vargas et al., 2000). A resposta imunológica

mediada pelos linfócitos T citotóxicos de camundongos anti HRSV parece estar associada aos resíduos de cisteína, uma vez que é significativamente reduzida, em relação ao vírus selvagem, quando a forma solúvel de vírus recombinantes, que não possuem esses resíduos, é apresentada (Bukreyev et al., 2006). Embora não se conheça muito bem o papel da proteína G em relação à imunidade inata, a diminuição de IFN γ é 70 vezes maior em camundongos, quando F e G estão presentes do que quando apenas F está sendo expressa (Polack et al., 2005).

Flanqueando a região conservada há dois segmentos protéicos, os quais têm altos níveis de variações antigênicas entre os aminoácidos 69-164 (G1) e 199-298 (G2) (Johnson, et al., 1987). A primeira região, que antecede o *cluster* de cisteína, possui estrutura em forma de haste devido a múltipla O-glicosilação, o que possivelmente torna a região de interação com o receptor distante suficiente do envelope viral, facilitando a interação vírus-célula (Melero et al., 1997). Já a segunda região parece ser mais externa, sendo mais acessível aos anticorpos e consequentemente mais susceptível à seleção de mutantes de escape (Melero et al., 1997). Dentre as proteínas virais a proteína G é a que apresentam maior variabilidade. Apresenta 53% de identidade, em termos de aminoácidos, entre os grupos A e B (Johnson et al., 1987; Melero et al., 1997) e divergência de aproximadamente 20% dentre isolados do mesmo grupo (García et al., 1994; Melero et al., 1997).

As regiões antigênicas da proteína G foram mapeadas de I a X (Figura 1), pelo sequenciamento de mutantes resistentes a anticorpos monoclonais (MRAMs) e em alguns casos pela correlação antigênica e diferenças em sequências de amostras clínicas e sua reatividade com anticorpos monoclonais (AcMs) sintéticos. Algumas mutações tornaram o vírus resistente à neutralização por determinados AcMs e até mesmo por soros humanos demonstrando que um número pequeno de alterações pode favorecer o escape viral (Sullender e Edwards, 1999). Baseando-se nesses fatos pressupõe-se que a infecção natural pelo HRSV pode gerar variantes em epítomos-chave da proteína G (Melero et al., 1997).

Figura 1 - Estrutura linear do mapa antigênico da proteína G (amostra *Long*). O primeiro retângulo hachurado representa o sinal de ancoragem da proteína. Sítios potenciais para O-glicosilação, de Ser e Thr, e para N-glicosilação são indicados por barras finas e grossas abaixo da estrutura protéica, respectivamente. Os círculos representam os resíduos conservados de cisteína (posições 173, 176, 182 e 186). Met-48 é a segunda metionina da proteína e é a região de início da tradução da forma solúvel. Ala 65 e Ala-64 estão presentes na proção N-terminal após a proteólise intracelular durante o processo de maturação. Os números indicam as posições dos aminoácidos que sofrem seleção por AcMs ou anticorpos policlonais (Collins et al., 2001).

Figura 2 – Estrutura tridimensional da proteína G, proposta por Langedijk et al., 1996. C e N indicam as regiões C-terminal e N-terminal, respectivamente. A primeira região variável semelhante à mucina (a), o domínio conservado (b) e a segunda região variável semelhante à mucina (c) estão representadas no modelo (Langedijk et al., 1996).

A proteína F (Figuras 3, 4 e 5) é uma glicoproteína do tipo I, ou seja, sua porção de ancoragem à membrana celular está localizada na porção C-terminal (intracitoplasmática), que contém um sinal de clivagem na porção N-terminal (Collins et al., 1996). Além disso, possui três domínios hidrofóbicos, o peptídeo de fusão, duas regiões de clivagem e resíduos de cisteína (Martín et al., 2006), e aceptores de açúcares e palmitato (Collins et al., 2001), sendo que o último localiza-se covalentemente ligado a região F1 (Arumugham et al., 1989) e regiões de septetos repetitivos hidrofóbicos (RH) (Martín et al., 2006). A região RHA localiza-se na porção adjacente ao domínio carboxi-terminal da subunidade F1, enquanto a região RHB localiza-se próxima ao domínio transmembrano (Sarmiento et al., 2009; Sugrue, 2006).

Figura 3 – Estrutura linear da proteína F. Os retângulos totalmente preenchidos representam os domínios hidrofóbicos, enquanto os parcialmente preenchidos representam os RHA e RHB. Os círculos preenchidos estão sobre as posições dos resíduos de cisteína da proteína e as regiões indicadas pelas setas indicam estão envolvidas no processo proteolítico. SP representa o peptídeo sinal, FP, o peptídeo de fusão e TM o domínio transmembrano. As cadeias F2 e F1 permanecem covalentemente unidas por pontes dissulfeto (S-S) após a clivagem do precursor F0. (Modificada de Martín et al., 2006).

A síntese da proteína é iniciada por um precursor inativo F0 de 574 aminoácidos o qual é modificado pela adição de ligações glicosídicas do tipo N (Collins et al., 1993) e clivado por uma protease intracelular semelhante à furina, presente no hospedeiro (Gonzales-Reyes, 2001) no complexo *trans*-Golgi, nas sequências em *tandem* de resíduos de arginina e lisina (Collins et al., 2001). Esta enzima promove a hidrólise de ligações peptídicas entre o grupo carboxila da arginina ou da lisina e o grupo amina de outro aminoácido qualquer (Freitas, 2006). A clivagem resulta nos segmentos F2 (109 aminoácidos), p27 (27 aminoácidos) e F1 (438 aminoácidos), sendo que F2 e F1 permanecem unidos por ligações dissulfídicas. Esta estrutura caracteriza a forma ativa da proteína (Collins e Graham, 2008).

O domínio F1 é hidrofóbico e responsável pela fusão celular (Collins et al., 1984) e pela ancoragem da proteína F ao envelope viral (Lawless-Delmedico et al., 2000). A região de ancoragem da proteína F relacionada ao processo de fusão vírus-célula, denominada peptídeo de fusão, localiza-se na porção N-terminal hidrofóbica do domínio F1 (Lawless-Delmedico et

al., 2000), sendo os aminoácidos das posições 19 a 26 desta região responsáveis pela ligação do vírus à membrana celular. Esses aminoácidos são bastante conservados dentre os paramixovírus e os pneumovirus, mas não entre as subfamílias. Entretanto, tanto paramixovírus quanto os pneumovirus apresentam glicídios nas posições 3 e 7 nessa região sendo estes aminoácidos considerados os mais críticos para manutenção da estrutura e função da proteína (Collins et al., 2001). Além disso, 15 resíduos de cisteína são 100% conservados dentre os grupos A e B do HRSV e o BRSV. Mutações nos resíduos 37, 313, 322, 333, 343, 358, 367, 393, 416, e 439 reduzem completamente, ou em parte, a expressão da proteína F do HRSV na superfície celular. Isto sugere que estes resíduos podem estar envolvidos com o transporte da proteína do complexo de Golgi para a superfície da célula (Day et al., 2006). Já o domínio citoplasmático (549-574 aminoácidos) parece não ter sua função associada ao processo de fusão uma vez que a remoção de um aminoácido ou de todo este domínio não interferiu no processamento, expressão ou fusão do HRSV às células (Branigan et al., 2006).

A porção F2 sofre clivagens em células de mamíferos pela furina resultando em três formas diferentes, F2a, F2b e F2c, que possuem padrões de migração de 22, 16 e 10 kDa, respectivamente. A porção F2c é lábil e as porções F2a e F2b são detectadas mais facilmente. As porções F2a e F2b são glicosiladas de formas diferentes nas células, o que pode ter implicações na função da proteína, interferindo em sua interação com a heparina sulfatada (HS) e na atividade de fusão em si (Rixon et al., 2002). Este segmento da proteína F é o mais divergente entre e dentro dos grupos antigênicos do HRSV, o que pode estar relacionado à sua provável localização fora do *core* interno, além de ser a principal região de N-glicosilação (Figura 5) (López et al., 1998). A subunidade F2 é responsável pela interação vírus célula espécie-específica, já que quimeras virais contendo a proteína G e subunidade F1 do HRSV e a subunidade F2 de BRSV infectam apenas linhagens celulares bovinas e as quimeras contendo a proteína G e a subunidade F1 de BRSV e F2 de HRSV infectam apenas linhagens celulares humanas (Schlender et al., 2003). Já a proteína F do HRSV A2 e CH18537 inteira pode ser expressa em linhagens de células estabelecidas de diversos mamíferos como as de morcego, macaco, cão, gato, camundongo, coelho, *hamster*, porco, vaca, cavalo, entre outras, e em células de anfíbios como a XLK-WG (rim de *Xenopus laevis* africano) (Branigan et al., 2006). O domínio F1 é dividido nas porções A, B e C que possuem regiões variáveis, determinadas pela análise dos mutantes que escaparam da neutralização por AcMs (Collins et al., 2001). Os MRAMs também estão relacionados à região F2, ao peptídeo de fusão a ao domínio transmembrano da proteína F (Ulbrandt et al., 2008).

Figura 4- Mapa antigênico da estrutura linear da proteína F (amostra *Long*). F2 e F1 estão representadas covalentemente unidas. RHA (HR1) e RHB (HR2), peptídeo sinal (SP), peptídeo de fusão (FP) e domínio transmembrano (TM) também estão representados. Os sítios ou áreas (*site/area*) das regiões antigênicas estão representadas em números romanos (I, II, IV, V, VI) enquanto as posições de alguns dos peptídeos que sofrem mutações na presença de AcMs ou policlonais (vide texto) estão representados por números cardinais (Modificado de Ulbrandt et al., 2008).

Figura 5 – Estrutura secundária da proteína F. Os cilindros representam as estruturas protéicas em α -hélice, os retângulos representam estruturas em lâmina tipo β . Os loops estão representados pelas voltas na figura. F2 e F1 estão representadas covalentemente unidas por pontes dissulfeto (S-S), sendo F1h e F2h α -hélices anfipáticas presentes na proteína. RHA e RHB estão representadas nas regiões F2 e F1, respectivamente (*Heptad repeat*), peptídeo de fusão (*Fusion peptide*) e domínio transmembrano (TM) também estão representados. Os sítios ou áreas (*site/area*) das regiões antigênicas estão representadas em números romanos (I, II, IV, V, VI). O segmento entre os resíduos 255-275 antecede uma estrutura hélice-loop-hélice. O domínio rico em cisteína (*Cysteine-rich region*) está representado na região F1. Tanto os domínios extracelular (*Extracellular domain*), transmembrano, que atravessa a membrana (*Membrane*) e intracelular (*Intracellular domain*), estão representados na figura (Modificado de López et al., 1998).

A proteína F interage com o complexo CD14/TLR4 presente em monócitos e estimula a produção de citocinas pró inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-8), promovendo a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo. Consequentemente, ocorre a ativação de diversos genes dependentes do NF- κ B, como os codificantes para citocinas inflamatórias (Polack et al., 2005). O domínio conservado rico em cisteína parece promover um efeito antiinflamatório, antagônico ao estimulado pela proteína F do HRSV, exercendo um papel de regulação de resposta imune (Polack et al., 2005).

A infecção viral inicia-se quando a proteína G do HRSV interage com o receptor da célula (Collins e Crowe, 2007; Collins e Grahnan, 2008). Alguns estudos demonstram que GAGs sulfatadas presentes na membrana celular, em particular a HS, são importantes na eficiência da infecção do HRSV *in vitro*, podendo talvez representar o primeiro passo para adesão do vírus à célula (Hallak et al., 2007; Krusat e Streckert, 1997; Teng et al., 2001). O sítio de ligação do HRSV à heparina localiza-se entre os aminoácidos 184-198 e 183-197 para os grupos A e B, respectivamente, ou seja, fora da região conservada (Feldman et al., 1999). Entretanto, a interação vírus - célula não ocorre apenas por interação de cargas entre o vírus e subunidades sacarídicas sulfatadas. O processo é dependente da conformação das GAGs, sendo necessário que apresentem em sua estrutura moléculas de N-sulfato e no mínimo 10 subunidades de sacarídeos para mediar a infecção pelo HRSV em culturas celulares, além da presença do ácido idurônico (Hallak et al., 2000). Outro fator que interfere no processo infeccioso pelo HRSV é o grau de sulfatação presente nas GAGs, sendo este mais crítico do que a cadeia de polissacarídeos (Martínez e Melero, 2000). Embora o processo de adesão do vírus esteja relacionado principalmente à proteína G, foi demonstrado que vírus mutantes, com deleção dos genes G e SH inteiros, são capazes de infectar células *in vitro*, sugerindo que a proteína F também possa interagir com a HS (Sugrue, 2006; Techaarporkul et al., 2001). Em células de rim de macaco verde (VERO), foram mapeados domínios de ligação à heparina (*heparin-binding domains, HBDs*) presentes na proteína F. Dois peptídeos denominados F16 e F55, representantes de HBDs lineares nas regiões entre F1 e F2 (peptídeos 141-147) e F1 (peptídeos 404-420), respectivamente, inibiram a ligação do vírus às células enquanto o peptídeo 26, referente ao HBD localizado na região F2 (peptídeos 201-217), inibiu a infectividade após a adesão viral (Crim et al., 2007).

Apesar dos estudos *in vitro* demonstrarem a dependência da presença de GAGs para a interação do HRSV à célula, não está claro como o processo ocorre dentre isolados clínicos não adaptados às células. Estudos demonstram que a interação entre a proteína G e a

fractalcina CX3CL1 (Harcourt et al., 2006; Sugrue, 2006) e a presença da RhoA, uma pequena proteína de ligação a guanina trifostatada (GTP), ativada pela isoprenilação durante a infecção pelo HRSV, também podem desempenhar algum papel no processo de adesão (Sugrue, 2006). Interações com anexinas II, ICAMs, receptores *Toll-like*, receptores para FNT e para proteínas surfactantes A ou D também podem estar associadas ao processo de ligação do HRSV às células *in vitro* (Crim et al., 2007; Collins e Crowe, 2007).

A internalização dos componentes do envelope viral parece ser um mecanismo regulatório pós-traducional que modula a expressão das glicoproteínas de superfície. A via da claritrina é responsável pela endocitose das glicoproteínas de superfície por células não-imunes, enquanto em células dendríticas imunes o processo ocorre via caveolina (Gutiérrez-Ortega et al., 2008), um domínio enriquecido em jangadas lipídicas, microdomínios da membrana plasmática enriquecidos com esfingolipídeos, colesterol e proteínas. A proteína F interage com jangadas lipídicas independentemente das outras proteínas de superfície e a proteína M é dependente da proteína F para interagir com o microdomínio (Fleming et al., 2006). Ainda não se conhece bem como as outras proteínas são internalizadas pelas células (Gutiérrez-Ortega et al., 2008).

Posteriormente à adesão e endocitose, ocorre a penetração viral. O envelope viral incorpora-se à membrana celular, fato que pode ser observado através da técnica de imunofluorescência (Routledge et al., 1987) e ocorre a fusão do vírus à célula, mediada pela proteína F. Este processo é pH independente (Sugrue, 2006), embora alterações em alguns peptídeos das regiões F1 e F2 diminuam o potencial fusiogênico do vírus e o aumento de pH auxilie na fusão *in vitro* (Sarmiento et al., 2009). Embora o mecanismo inicial de fusão do HRSV à célula ainda não esteja bem elucidado, acredita-se que se inicie com a forma “madura” da proteína F e sem o envolvimento da proteína G (Sugrue, 2006). As RHs formam uma estrutura espiral tripla, contribuindo para a aproximação da membrana celular ao envelope viral e desempenhando um papel fundamental para o processo de fusão (Sugrue, 2006). Observações realizadas por vídeo microscopia demonstraram que o processo de fusão *in vitro* após a adesão do HRSV à célula demora a começar, mas que uma vez iniciada, a fusão ocorre rapidamente (Collins e Crowe, 2007).

Após a penetração viral, o nucleocapsídeo é liberado e o ciclo replicativo ocorre no citoplasma sem que haja envolvimento nuclear (Collins et al., 2001; Collins e Crowe, 2007). A enzima RNA polimerase RNA dependente se liga ao gene promotor na porção 3' do RNA genômico encapsidado, próxima à região *leader* extragênica e a transcrição tem início no

sentido 3'→5' (Fearn et al., 2002). O primeiro gene, NS1, é transcrito e liberado (Collins et al., 1996) e a polimerase recomeça o processo por um mecanismo sequencial de início/fim, produzindo uma série de RNAs mensageiros (mRNAs) subgenômicos (Fearn et al., 2002). Sendo assim, com exceção do gene M2 que contém duas ORFs e produz duas proteínas, MS-2 e MS-1, cada gene é transcrito separadamente e traduzido como uma única proteína viral. Os mRNAs recebem um *cap* na porção 5' e são poliadenilados na porção 3' (Collins e Crowe, 2007) podendo ser detectados intracelularmente após 4 a 6 horas, sendo o pico de síntese após 12 a 16 horas, tal como as proteínas (Collins et al., 2001). Quando a polimerase falha no reconhecimento dos sinais de início e fim, produz fragmentos de mRNAs maiores que incluem dois ou mais genes adjacentes e as regiões intergênicas ocorrendo o gradiente de transcrição polar. A polimerase continua sintetizando o mRNA até encontrar o próximo sinal de fim (Collins et al., 1996, 2001; Collins e Graham, 2008). O antigenoma, constituído de um RNA intermediário positivo (+ssRNA), é sintetizado num modo anti-terminação, sendo ignorados os sinais de início e fim de cada gene, a sequência *leader* e o gene NSI, que servirá de molde para a progênie viral, ou seja, o -ssRNA (Collins et al., 1996; Collins e Graham, 2008) sendo este processo regulado pela proteína M2-2, como mencionado anteriormente (Collins e Crowe, 2007; Collins e Graham, 2008; Shimdt et al., 2001).

A maturação viral ocorre com a formação do complexo ribonucleoproteico e proteínas associadas a ele, cujo acúmulo forma os corpúsculos de inclusão (Sugrue, 2006). As glicoproteínas são modificadas por glicosilação durante a passagem pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi e interagem com a membrana plasmática. A proteína M se agrega às interações não convalescentes às extensões intracitoplasmáticas das glicoproteínas presentes na superfície interna da membrana plasmática. O nucleocapsídeo alcança a superfície e então ocorre o brotamento, momento em que o vírus adquire o envelope lipoproteico (Kingsbury, 1990). Também foi observada outra forma de maturação na qual o vírus é montado em vesículas intracelulares, incorporado à membrana citoplasmática e liberado para o espaço extracelular por exocitose (Arslanagic, 1996). Existem evidências de que a maturação do HRSV ocorre nos domínios de jangadas lipídicas presentes nas células (Sugrue, 2006; Yeo et al., 2009). A distribuição de proteínas virais e desses lipídeos foi analisada por imagens e, além disso, a associação entre ambos é desfeita quando a células são tratadas com ciclodextrina, um agente desestabilizante de jangadas lipídicas. Aparentemente o palmitato, presente nas jangadas lipídicas, serve como um alvo para as proteínas F e G, uma vez que ambas são palmitadas, mas isto ainda não está claro (Sugrue, 2006). Da mesma

forma, ainda existem dúvidas se a associação entre o HRSV e as jangadas lipídicas ocorre antes da maturação viral ou se resulta do processo infeccioso (Yeo et al., 2009).

Inicialmente, pensava-se que o HRSV era antigenicamente monotípico. Entretanto estudos de neutralização cruzada utilizando animais contrariaram esta idéia (Coates, 1966). Através da aplicação de monoclonais contra as proteínas do HRSV, foram verificadas variações antigênicas nas proteínas P (Gimenez, et al., 1984), N (Anderson et al., 1985; Leonov et al., 1995; Ward et al., 1984) F e G (Anderson et al., 1985). As variações antigênicas nas proteínas F e G resultaram na divisão de dois grandes grupos A e B (Anderson et al., 1985; Gimenez, et al., 1986) e mais tarde nos subgrupos A1 a A6 e B1 a B4 (Anderson et al., 1991). Os dois grupos relacionam-se antigenicamente em 25% como um todo, sendo que, para a proteína F essa relação é de 50% e para a proteína G é apenas de 1 a 7% (Collins e Grahnan, 2008; Hendry et al., 1988; Johnson et al., 1987). Assim sendo, a maior divergência entre os grupos A e B é encontrada na proteína G (Anderson et al., 1985; Gimenez et al., 1986; Mufson et al., 1985). Posteriormente, estudos moleculares sobre a diversidade genética das amostras isoladas realizados por Cane et al. (1991) detectaram diferenças nas seqüências de nucleotídeos pertencentes ao grupo A, havendo mais de 20% de divergência entre elas. Para amostras do grupo B o estudo das seqüências de nucleotídeos do gene G em amostras isoladas durante 30 anos apresentou até 9% de divergência entre os aminoácidos traduzidos (Sullender et al., 1991). Em termos de nucleotídeos, os genes G e F apresentam variação de 53% e 90%, respectivamente, entre os grupos A e B (Collins e Grahnan, 2008).

A análise filogenética da região hipervariável (G2) do gene G permitiu a identificação de vários genótipos dentro dos diferentes grupos. Os genótipos GA1 a GA6 e GB1 a GB4 foram os primeiros a serem descritos (Peret et al., 1998) seguido pelo GA7 (Peret et al., 2000). Em 2001, os genótipos SAA1 (grupo A), SAB1, SAB2 e SAB3 (grupo B) foram descritos pela primeira vez na África do Sul (Venter et al., 2001). O genótipo BA foi encontrado em amostras Argentinas do ano de 1999, e é um variante do genótipo GB3 que apresenta uma duplicação de 60 nt, flanqueada por sequencias repetitivas GUGU, aumentando o polipeptídeo traduzido em 20 aminoácidos (260-279) (Trento et al., 2003, 2006). Embora a região G2 seja a mais utilizada para genotipagem e classificação do HRSV, a porção N-terminal da proteína G também é variável. A análise filogenética de amostras do grupo B demonstrou que podem ser agrupadas em dois clados diferentes denominados Tu-GB1 e TuGB2, sendo o último ainda subdividido em TuGB2a e TuGB2b (Fodha et al., 2008). A região N-terminal da proteína F também é variável e a análise dos nucleotídeos 23 a 572 (550

nt) demonstrou que os grupos A e B possuem nove e três clados diferentes, respectivamente, denominados FA1 até FA9 e FB1, FB2 e FB3. Os genótipos FA1, FA3 e FA8 são ainda subdivididos em 4, 3 e 2 subgenótipos, respectivamente. (Kim et al., 2007).

Em cada epidemia pode ocorrer a co-circulação de diversos genótipos dos grupos A e B. Em Salvador - BA, foram encontradas amostras GA5, GA2, GA7, GB3 e SAB3 circulantes no ano de 1999 (Moura et al., 2004), enquanto em São Paulo - SP foram encontrados os genótipos GA2, GA5, GA7, GB3, GB4 e GB5 circulando em um período menor que um ano entre 1999 e 2000 (Vieira et al., 2007). Em São Paulo - SP os grupos A e B co-circularam em 2004, com predomínio do grupo A, tendo sido encontrados os genótipos GA2, GA5, SAB1, SAB3 e BA (Campos et al., 2007), enquanto em Campinas - SP no mesmo período também foram detectados os genótipos GA2, GA5, SAB1, SAB3 e BA, além de SAA1, GB3 e URU2 (da Silva et al., 2008). Na África do Sul, os genótipos GA5, GB3 e SAB3 foram encontrados em todos os anos no período de 1997 a 2000 e GA7, SAB1 e SAB2 ocorreram em baixa frequência nesses anos. Para o grupo A, foi observada a substituição gradual do genótipo dominante, sendo que GA2 predominou por mais de um período, enquanto os genótipos GB3 e SAB3 foram co-dominantes durante os quatro anos (Venter, 2001). Já em 2006 o GA5 foi predominante dentre amostras colhidas em um hospital também da África do Sul, embora apenas 19 amostras tenham sido analisadas (Visser et al., 2008). Em Estocolmo, Suécia, 234 amostras positivas para HRSV do período de 2002 a 2003 foram seqüenciadas e o GB3 foi predominante. Também foram seqüenciadas amostras SAB1, GA2 e GA5 (Östlund et al., 2008). Em três epidemias não consecutivas (1990-2001; 2000-2001; 2003-2004) na China houve predomínio do grupo A, sendo que o genótipo GA2 representou mais de 90% das amostras (Zhang et al., 2007). Nos períodos de 2002 a 2003 e 2003 a 2004 os principais genótipos encontrados em dois vilarejos rurais, próximos à Delhi, na Índia, foram GA2 e GA5 no primeiro ano e GA5 e BA no ano seguinte (Parveen et al., 2006). Na Itália também houve predomínio dos genótipos GA2 e GA5 em amostras do grupo A durante 1997 a 2006 (Montieri et al., 2007), tal como na Alemanha nos anos de 1998 a 2007, sendo que no último o genótipo GA7 ocorreu apenas nos períodos de 1999 a 2000 e 2002 a 2003 (Reiche e Schweiger, 2009). Em relação à proteína F, em amostras analisadas na África do Sul houve similaridade de 90% entre subgrupos A e B, em relação ao gene F a e a maioria das mutações observadas ocorreu em nível nucleotídico e não alteraram a estrutura protéica (Agenbach et al., 2005). No entanto, a comparação entre a região dos primeiros 572 nt com a proteína F inteira demonstrou ainda que a primeira apresenta maior variabilidade que a segunda, embora

o domínio C-terminal também seja variável. A epidemiologia molecular revelou que o modelo de circulação do vírus também se baseia na alternância de genótipos circulantes, tal como ocorre quando a proteína G é analisada. Além disso, a análise filogenética do HRSV utilizando a proteína F está intimamente relacionada com a análise baseada na proteína G, ainda que a última seja mais variável que a primeira (Kim et al., 2007).

A variabilidade em nível nucleotídico do gene G do HRSV pode ocasionar substituições não sinonimas e consequentemente pode ocorrer seleção positiva de seus aminoácidos ao longo do tempo (Botosso et al., 2009; Zlateva et al., 2004). Em muitos casos as regiões glicosiladas da proteína G estão envolvidas na seleção positiva do HRSV tanto do grupo A (Botosso et al., 2009; Montieri et al., 2007; Zlateva et al., 2004), quanto do grupo B (Botosso et al., 2009; Zlateva et al., 2005). No entanto, amostras do grupo B aparentemente suportam variações mais “drásticas” do que amostras do grupo A (Zlateva et al., 2005). Apesar disso, amostras dos grupos A e B apresentam modelos filodinâmicos semelhantes, já que ambos são caracterizados pela dinâmica espacial e temporal global (Zlateva et al., 2005), além do fato de que a capacidade infecciosa do HRSV de ambos os grupos permite a rápida dispersão de novas variantes (Montieri et al., 2007; Zlateva et al., 2005).

Os principais genótipos do grupo A circulantes na Bélgica foram GA2 e GA5 e GA1, GA4 e BE/A1 e desapareceram com o passar do tempo (Zlateva et al., 2004). A epidemiologia do grupo A aparentemente é determinada por fatores locais como resistência imune da comunidade a determinados genótipos. Altos níveis de imunidade materna ou altos níveis de anticorpos do descendente a uma determinada amostra circulante podem diminuir a severidade dos genótipos circulantes em uma epidemia em particular, e/ou restringir sua circulação em epidemias subsequentes (Cane et al., 2001). Isto pode explicar o desaparecimento de determinados genótipos na mesma comunidade (Zlateva et al., 2004). Já o mesmo genótipo do HRSV B pode permanecer na mesma comunidade por um período de tempo relativamente longo, embora seja menos freqüente na população (Zlateva et al., 2005). Isto pode ser explicado pelo fato de que quando a primeira infecção é por HRSV A, a reatividade cruzada com o grupo B é maior do que quando o inverso ocorre e possivelmente isto justifica a maior freqüência do grupo A em relação ao B (Muelenaer et al., 1991; Ogra, 2004).

Os dados epidemiológicos demonstram que os vírus circulantes em regiões distantes e anos diferentes podem ser filogeneticamente mais próximos do que os isolados da mesma epidemia e mesmo local (Montieri et al., 2007; Parveen et al., 2006; Zhang et al., 2007) e que

fatores como imunidade e desempenho biológico (*fitness*) do vírus podem determinar o predomínio de determinados genótipos em um surto (Parveen et al., 2006). Além disso, algumas mutações em aminoácidos na região G2 tendem a ser revertidas com o passar do tempo, segundo o modelo genético denominado *flip-flop*, o que reflete a mudança da imunidade na população e a limitação do repertório de aminoácidos funcionalmente viáveis em regiões específicas do vírus (Botosso et al., 2009). No entanto, ainda que limitadas, as alterações refletem a variabilidade genética do HRSV e as mutações fazem com que o mesmo indivíduo possa ser infectado diversas vezes durante a vida, ocasionando os surtos anuais (Peret et al., 2000).

O HRSV possui uma típica sazonalidade, predominando nos meses de inverno, em climas temperados, e durante as estações chuvosas nos países de climas tropicais e subtropicais (Collins et al., 1996). As epidemias duram cerca de cinco meses atingindo o pico geralmente na metade do surto, quando são registradas 40% do total de infecções (Collins et al., 2001). No Brasil, o surto ocorre mais frequentemente entre os meses de abril a agosto (Sutmoller et al., 1995; Thomazelli et al., 2007), embora possa ocorrer mais raramente o ano todo (Oliveira et al., 2009; Thomazelli et al., 2007). Cintra et al. (2001) analisaram amostras colhidas de crianças residentes na cidade de Ribeirão Preto (SP) e observaram maior frequência do HRSV durante o outono. Diferenças entre os picos dos surtos nos estados brasileiros possivelmente se relacionam a diversidade climática do país (Checon et al., 2002). Além do fator climático, hábitos sociais que proporcionam a aglomeração populacional, aumentam o risco de contaminação por HRSV (Hillis et al., 1971). No entanto, um modelo matemático revelou que, em alguns países a época de surtos do vírus não coincide com o período escolar, quando o contato social entre elas é maior e que o fator climático é a variável que mais contribui para as epidemias do HRSV (Weber et al., 2001). As condições atmosféricas, principalmente a temperatura, parecem ter grande influência sobre os surtos do HRSV e suas variações. A menor incidência de raios ultravioleta (UVB) ocorre no inverno e, portanto a produção de vitamina D pelo organismo também é menor nesta época do ano. Esta vitamina é importante para o sistema imune, particularmente na resposta imune inata, e a falta desta parece contribuir ainda mais para o aumento de infecções por HRSV no inverno (Noyola e Mandeville, 2008).

O HRSV tem distribuição mundial, podendo acometer todas as faixas etárias (Collins e Crowe, 2007; McIntosh e Chanock, 1990), sendo considerada a principal causa de infecções no trato respiratório inferior de recém nascidos e crianças com até um ano de idade,

provocando principalmente pneumonia e bronquiolite (Collins e Crowe, 2007). A transmissão ocorre por meio da propagação de aerossóis provenientes de secreções respiratórias infectadas ou objetos contaminados (Collins e Crowe, 2007; Hall et al., 1980, 1981;). Pequenas partículas de aerossol não são suficientes para transmissão do vírus (Collins e Crowe, 2007; Hall et al., 1980). As principais vias de entrada do vírus são o nariz e a mucosa conjuntiva e o período de incubação até a manifestação da doença é de quatro a cinco dias (Collins e Crowe et al., 2007).

No início da infecção o vírus se replica na nasofaringe e pode atingir títulos de 10^4 a 10^6 dose infectante em cultura de tecido 50% por mL (DICT₅₀/mL) na secreção nasal em crianças de até seis meses de idade. O mecanismo de dispersão do vírus do trato respiratório alto para o baixo ainda não é bem conhecido, mas possivelmente ocorre via epitélio respiratório ou secreções aspiradas. Além disso, o vírus é capaz de dispersar célula a célula, sem a passagem pelo fluido extracelular. O vírus pode se dispersar para brônquios e bronquíolos após um a três dias de rinorréia. O título viral no trato respiratório baixo não é bem conhecido, mas autópsias demonstraram que o título é alto nos casos de pneumonia fatal e baixo nos caso de bronquiolite fatal (Collins et al., 2001).

A infecção pelo HRSV resulta em modificações de genes celulares e de genes que regulam fatores como citocinas, quimiocinas e moléculas de superfície celular. Alguns destes fatores relacionam-se às atividades antivirais enquanto outros estimulam o influxo e ativação de células EN (exterminadoras naturais), granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, efetivos na resposta imune adaptativa (Collins e Graham, 2008). No início da infecção os vírus podem atingir os alvéolos e infectar as células epiteliais das vias aéreas, induzindo a secreção de fatores como, por exemplo, os INF α e β e NF- κ B. No período tardio da infecção, a infecção viral é acompanhada pela infiltração de células inflamatórias nos pulmões, induzidas por quimiocinas e citocinas. Neste ponto, células mononucleadas de sangue periférico são observadas em torno dos alvéolos (Bueno et al., 2008).

Os linfócitos T CD4⁺ auxiliares (LTa) podem promover respostas imunes tipo Ta1 ou Ta2, que disparam respostas imunes citotóxica e humoral, respectivamente. Na resposta imune citotóxica, os linfócitos T CD8⁺ são ativados e promovem a destruição da célula infectada, enquanto na resposta imune humoral, os linfócitos B são estimulados a produzir anticorpos (Collins e Graham, 2008; Graham et al., 2002; Tripp, 2004). A meia-vida dos linfócitos T efetores é curta; no entanto um “pool” de linfócitos T de memória é mantido. A resposta imune humoral mediada pelos linfócitos B é importante na resistência ao HRSV em

casos de reinfecção e possui meia-vida longa, como os linfócitos T de memória (Tripp, 2004). A neutralização no trato respiratório desempenha um papel importante no clareamento viral, tal como na proteção nos casos de reinfecção pelo vírus. A IgA participa da neutralização no trato respiratório alto, onde a ação da IgG não é eficiente. No entanto, o tempo de duração desta Ig secretória é curto, embora aumente nos casos de reinfecção. Já a IgG é capaz de neutralizar o vírus no trato respiratório baixo e portanto promove promoção eficiente neste compartimento (Collins e Graham, 2008).

Os anticorpos de classe IgG passam da mãe para a criança pela via placentária entre a 26ª e 32ª semanas de gestação, o que pode explicar o maior risco de prematuros apresentarem sintomas mais graves da doença. No entanto, muitos recém nascidos são infectados e desenvolvem doenças respiratórias causadas pelo vírus, mesmo na presença de anticorpos maternos. Aparentemente, na maioria dos casos, os anticorpos de neutralização maternos oferecem proteção contra o HRSV (Collins e Crowe Jr, 2007) e há evidências que a transmissão transplacentária é subgrupo-específica (Vieira et al., 2007). Um estudo envolvendo crianças menores de um ano de idade demonstrou que nesta fase a maioria dos anticorpos detectados é de origem materna e que altos títulos destes podem proteger contra infecções pelo vírus (Roca et al., 2003). Entretanto, há evidências de que crianças de zero a seis meses podem montar uma resposta imune mais eficiente quando os títulos dos anticorpos maternos são baixos, sugerindo que a imunossupressão somada à imaturidade do sistema imune das crianças seja o principal obstáculo para o desenvolvimento da resposta humoral eficiente (Cox et al., 1998; Shinoff et al., 2008). Brabdeburg et al. (1997) sugeriram que a IgG materna pode mediar a imunossupressão temporária em crianças e que na maioria dos casos os anticorpos maternos não neutralizam os vírus que infectam seus filhos.

A soroconversão em crianças menores de três meses é rara (Brabdeburg et al., 1997; Queiróz et al., 2002; Tsutsumi et al., 1995), mas passa a ocorrer a partir dos oito meses de idade (Tsutsumi et al., 1995). Os anticorpos IgG HRSV específicos declinam e atingem baixos títulos após um ano da prima infecção. Após a reinfecção pelo HRSV, os anticorpos atingem altos títulos rapidamente, sendo detectáveis em cinco a sete dias (Ogra, 2004).

A resposta dos anticorpos às proteínas F e G, de classe IgG anti-HRSV, são principalmente de subclasses 1 e 3, e indicam natureza antigênica destas moléculas (Ogra, 2004). O pico de produção de IgG3 é de aproximadamente três semanas após a infecção e posteriormente, o título desta imunoglobulina começa a declinar. Já a IgG1 tem seu pico durante quatro semanas e seu decaimento ocorre após alguns meses (Hornsleth et al., 1985).

As crianças desenvolvem “forte” resposta imune contra antígenos das proteínas F e G, sendo que anticorpos contra a região conservada da proteína G também são produzidos (Shinoff et al., 2008). Estudos demonstram que anticorpos anti-proteína F conferem imunidade cruzada entre os grupos A e B do HRSV enquanto a resposta anti-proteína G é grupo específica (Ogra, 2004). Outro aspecto importante em relação à resposta imunológica desencadeada por essas proteínas foi verificado por meio de experimentos utilizando vírus vaccíneos recombinantes, que expressavam ou F ou G. As proteínas induziram diferentes tipos de resposta mediadas por LTa em camundongos BALB/c, demonstrando que a proteína F levou preferencialmente a uma resposta Ta1, enquanto a proteína G, disparou uma resposta Ta2 (Alwan e Openshaw, 1993; Melero et al., 1997).

Em crianças com idade entre zero a nove meses de idade de 25 a 40% das infecções atingem o trato respiratório abaixo da laringe. As infecções assintomáticas são raras (Collins et al., 2001; Collins e Crowe, 2007). O tempo médio de incubação do HRSV é de 4,4 dias, sendo que em 5% dos casos, os sintomas aparecem antes, em 3,1 dias e em 95 % dos casos os sintomas iniciam-se em 6,3 dias após a infecção (Lesser et al., 2009). Na fase prodrômica os principais sintomas apresentados pelas crianças são rinorréia acompanhada por perda de apetite. A tosse pode aparecer nesta fase, mas é mais comum após um intervalo de um a três dias, podendo ser acompanhada de coriza e febre baixa e posteriormente pode haver início de um resfriado. Se a infecção é branda, os sintomas não progridem após este estágio (Collins et al., 2001; Collins e Crowe, 2007). O HRSV pode ainda estar envolvido em processos de inflamação como asma e otite média aguda (Ison et al., 2002) e em complicações de distúrbios neurológicos (Millichap e Wainwright, 2009). O exame clínico geralmente demonstra taquipnéia moderada, ronco difuso e sibilância e a recuperação em geral, leva de sete a 12 dias (Collins et al., 2001; Collins e Crowe, 2007). Em casos mais severos, a criança apresenta dispnéia e a hiperexpansão do peito é evidente, podendo haver retração intercostal e subcostal. A criança rejeita a alimentação e a taquipnéia severa é comum, mesmo quando aparentemente não há cianose. No estágio avançado da doença a criança se cansa e fica apática e a hipóxia é mais grave podendo levar à falência respiratória. A hipóxia geralmente ocorre devido anormalidades na baixa taxa de ventilação/perfusão. A maioria das crianças está hipoxêmica quando dão entrada nos hospitais e permanecem durante algumas semanas, mesmo que estejam recuperadas (Collins et al., 2001).

Alguns trabalhos revelaram que pode haver correlação entre a severidade da doença com as características antigênicas do HRSV. A gravidade pode estar mais relacionada com o

grupo A (Hall et al., 1990; Imaz et al., 2000; McConnochie et al., 1990; Taylor et al., 1989; Walsh et al., 1997) ou mais relacionada ao grupo B (Hornseeth et al., 1998; Strallio et al., 1994; Zelaya et al., 1994). Em contrapartida, outros autores não observaram esta correlação (Brouard et al., 1993; McIntosh et al., 1993; Russi et al., 1989; Takahashi, 2001). Cintra et al. (2001) também não relacionaram o grupo do vírus com a severidade da doença, mas o grupo B foi mais freqüente em crianças com fatores de risco para a gravidade da doença. Em contrapartida, o grupo A pareceu estar mais associado às hospitalizações na cidade de Uberlândia, MG, entre os anos de 2000 a 2007, embora a análise estatística também tenha demonstrado que não houve associação entre a gravidade da doença e o grupo do HRSV (Oliveira et al., 2008). Um estudo revelou ainda, que pode haver correlação do genótipo do HRSV com a severidade da doença, tendo em vista diversidade da glicoproteína G, sendo o GA3 mais relacionado com a gravidade da infecção (Martinello et al., 2002). Por outro lado, Fodha et al. (2007), concluíram que o grupo e o genótipo do HRSV não se correlacionam com a gravidade da doença, mas que fatores com idade gestacional menor do que 37 semanas, peso abaixo de 2,5 quilos, idade cronológica menor que 28 dias e carga viral presente no aspirado de nasofaringe podem tornar a doença mais severa. A idade da criança também foi correlacionada à severidade por Marguet et al., 2009.

A mortalidade não é comum em países desenvolvidos, sendo que nestes as maiores taxas se encontram entre as crianças com doenças subjacentes (Collins e Crowe, 2007), tais como; displasia broncopulmonar (Groothuis et al., 1988), hipertensão pulmonar e doença cardíaca congênita (MacDonald et al., 1982) e imunodeficiências (Collins et al., 2001). Nos países em desenvolvimento, o índice de morbidade e mortalidade infantil por doença respiratória aguda (DRAs) ainda é elevado (Anderson et al., 1990; Nascimento et al., 1991; Rudan et al., 2008), sendo a pneumonia a principal causa de mortes de crianças com menos de 5 anos de idade (Rudan et al., 2008). O risco de mortalidade pelo HRSV em crianças aumenta em casos de displasia broncopulmonar e de doença cardíaca congênita (Collins e Crowe, 2007). Adultos que apresentem comprometimento dos sistemas cardíaco, imune e respiratório podem apresentar sintomas graves da doença (Ison et al., 2002), assim como idosos (Collins e Crowe, 2007; Falsey, 1998; Ison et al., 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 2005 que 64 milhões de crianças são infectadas pelo HRSV e que destas, 160.000 morrem por ano em todo o mundo (Collins e Graham, 2008). Na Itália, um estudo envolvendo 164 crianças hospitalizadas com infecção do trato respiratório baixo, demonstrou que 40,9% das crianças haviam sido

infectadas pelo HRSV (Corsello, 2008), enquanto outro estudo demonstrou que 24,3% de 124 crianças que apresentaram infecção aguda do trato respiratório estavam infectadas pelo HRSV, sendo superado apenas pelos casos positivos para *Picornaviridae* (43,6%) (Fabbiani et al., 2009). Na Espanha, de 316 recém-nascidos 82% que tiveram infecções respiratórias do trato alto, 41,1% estavam infectados por rinovírus, membro da família *Picornaviridae*, e 35,2% por HRSV (Bueno-Campaña et al., 2008). No Brasil, estudos realizados no Rio de Janeiro em 1995 demonstraram que as DRAs perfizeram 25-50% das consultas aos postos de saúde e cerca de 2/3 dos atendimentos de emergência em hospitais (Stumoller et al., 1995). Um estudo realizado em 2003 demonstrou que de 336 crianças menores de cinco anos, atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), 24,1% delas estavam infectadas pelo HRSV (Thomazelli et al., 2007). Outro estudo realizado em São Paulo, entre 2005 e 2006, também com amostras de crianças menores de cinco anos, provenientes da Santa Casa de Misericórdia, revelou que de 455 casos incluídos no estudo, 30% apresentou positividade para algum vírus, sendo que em 73,03% foi detectado HRSV (Pecchini et al., 2008) .

A única droga antiviral aprovada para tratamento do HRSV é a ribavirina aerolizada, um análogo de nucleosídeo. A ribavirina tem grande importância no tratamento de adultos imunocomprometidos, sobretudo transplantados de medula óssea. Novos medicamentos como o RSV604, uma benzodiazepina com atividade anti-HRSV submicromolar e a tecnologia do RNA de interferência (RNAi) , que reduz a produção de proteínas por meio da inibição da transcrição de uma sequência alvo do RNAm, estão em fase de desenvolvimento (Nokes e Cane, 2008).

Até o momento, não foi desenvolvida nenhuma vacina eficaz contra o HRSV, apesar dos esforços de pesquisadores do mundo inteiro. Os principais obstáculos para imunização são a imaturidade do sistema imune nos primeiros anos de vida e o efeito supressor dos anticorpos maternos (Collins e Gahan, 2007), além da variabilidade genética do vírus, principalmente em relação à proteína G (Peret et al., 1998). Na década de 60 uma vacina utilizando o HRSV inativado com formalina (FIRSV) foi administrada em crianças soronegativas. No entanto, quando expostas ao vírus essas crianças foram acometidas à doença de forma mais severa e duas delas foram a óbito (Kim et al., 1969). A ineficiência da vacina foi atribuída à destruição de epítomos-chave durante o processo de inativação. No entanto, a vacina levou ao disparo de respostas imunes como, por exemplo, do tipo Ta2, sugerindo que a elevação da gravidade da doença após a vacinação não poderia ser atribuída

apenas à degradação dos antígenos (Morghaddan et al., 2006). Um fator que pode explicar falta de proteção das vacinas inativadas é que os anticorpos produzidos contra a mesma são de baixa avidéz ao vírus e a maturação da afinidade parece ser essencial para que haja proteção, tendo em vista a capacidade protetora de AcMs humanizados anti-F contra o HRSV. A falta de maturidade da afinidade se deve a deficiência da ativação do RTL (Receptor *Toll-like*) de linfócitos B. A inclusão de RTL antagonistas à formulação da vacina poderia ser uma opção para tornar esta vacina segura e eficiente (Delgado et al., 2009).

Existem alternativas para o desenvolvimento de vacinas anti-HRSV como as provenientes de recombinação genética. Um exemplo é a vacina recombinante entre o vírus Sendai e as proteínas F e hemaglutinina-neuraminidase (HN) de HRSV e parainfluenza humano, respectivamente, que confere proteção em camundongos (Zhan et al., 2008). Outra vacina recombinante é a MEDI-534, uma construção quimérica que possui genes de fusão entre a HN do parainfluenza humano 3 e a proteína F do HRSV inseridos em um genoma de parainfluenza bovino 3, já que o vírus bovino se replica mas não causa doença em humanos. Em macacos esta vacina induziu anticorpos anti-HRSV após o desafio com vírus padrão (Tang et al., 2008).

As alternativas em termos de medicamento preventivo para evitar que crianças do grupo de risco sejam infectadas são o RespiGam (Genesis Biopharmaceuticals, Hackensack, Nova Jersey, USA), que consiste em IgG de soro policlonal humano fracionado pré testado contra o HRSV, e o Palivizumab (Synagis; MedImmune Inc., Gaithersburg, Maryland, USA), um anticorpo IgG1 monoclonal humanizado contra a proteína F, único AcM aprovado para profilaxia para o HRSV. O Palivizumab protege de 50 a 100 vezes mais do que o RespiGam e permite administração intramuscular. No entanto, alguns recém-nascidos não são protegidos contra o HRSV por este anticorpo, principalmente os que desenvolvem a forma grave da doença e, além disso, por se tratar de um anticorpo de classe IgG, tem pouco efeito sobre a replicação viral no trato respiratório alto (Nokes e Cane, 2008) onde a imunidade de mucosa de classe IgA é mais eficiente (Collins e Graham, 2008). Uma variação do Palivizumab proveniente de maturação de afinidade, denominado Motavizumab (MEDI-524) está em fase III de testes pré-clínicos e foi 20 vezes mais potente *in vitro* e mais efetivo em doses menores *in vivo* e sua administração foi tão segura quanto à do Palivizumab (Weisman, 2009). Embora os anticorpos monoclonais humanizados sejam eficientes na prevenção contra o HRSV, existem estudos demonstrando que o vírus A2 sofre mutações *in vitro* após sucessivos cultivos na presença do Palivizumab na região da proteína F e torna-se resistente ao anticorpo

(Zhao et al., 2004), fato que também foi observado em estudos com ratos (Zhao et al., 2005). Além disso, ensaios de competição entre o vírus A2 selvagem e o mutante denominado MP4, proveniente da seleção pelo Palivizumab, demonstraram que ainda que a proporção seja de 1000 A2:1 MP4, o MP4 torna-se o vírus dominante em culturas celulares mesmo na ausência do anticorpo, substituindo o vírus selvagem, apresentando dominância *in vivo* (Zhao et al., 2006).

Os mecanismos de escape viral podem estar ligados a modificações conformacionais das proteínas de superfície do HRSV, tais como o fato da proteína F se apresentar de duas formas iniciais (madura e imatura ou “incorreta”) e da alta expressão da forma Gs no ambiente de infecção. Os anticorpos são produzidos preferencialmente contra as formas imaturas e solúveis das proteínas F e G, respectivamente, e com a saturação deste tipo de resposta imune, o vírus escapa da neutralização (Sakurai et al., 1998; Collins e Graham, 2008). Outro fator importante a ser considerado, é que a proteína G é uma molécula heterogênea, apresenta cadeias de açúcar (Collins e Graham, 2008), muitas delas localizadas em regiões hipervariáveis, as quais sofrem alterações posicionais ao longo do tempo, driblando o sistema imune (Montieri et al., 2007; Zlateva et al., 2004).

A presença de quasispecies na população viral também pode contribuir para que o HRSV não seja reconhecido pelo sistema imune e ocorra seleção de novas mutações (Marsh et al., 2007; Yui et al., 2003). O conceito de quasispecies surgiu em 1971 com a teoria de Eigen sobre a capacidade adaptativa dos *replicons* primitivos que estão presentes na Terra até os dias de hoje (Domingo et al., 1999). Posteriormente, em 1977, Eigen e Shuster demonstraram que a distribuição equilibrada das sequências dependia dos processos de mutação e seleção (Nowak MA e May RM, 2000). Em 1978 Domingo et al., descreveu a heterogeneidade do bacteriófago Q β , o que foi considerado um marco para os estudos das quasispecies virais (Domingo e Wain-Hobison, 2009). Posteriormente diversos estudos sobre quasispecies virais foram realizados, principalmente envolvendo vírus da febre aftosa (FMDV) (Arias et al., 2001; Martín e Domingo, 2005; Perales et al., 2009; Ruiz-Jarabo et al., 2002; XingWen, 2009), vírus da estomatite vesicular (VSV) (Quer et al., 2001), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Mahalanabis et al., 2009; Malet et al., 2009), vírus da hepatite C (HCV) (Gal-Tanamy, 2008; Jardim et al., 2009) e B (HBV) (Wang, 2009), vírus influenza (Kongchanagul et al., 2008) e outros. A dinâmica populacional dos vírus de RNA assemelha-se à dos replicons já que também geram mutantes durante o processo de replicação

em consequência da ação das RNA polimerases e das retrotranscriptases virais (mecanismo de *error-prone* ou propenso ao erro) (Holland et al., 1992).

As quasispecies virais são definidas pela sequência máster, ou seja, predominante, e pela dinâmica de distribuição de mutantes, em minoria, presentes na mesma população. No entanto, as alterações na informação genética são limitadas já que quando não há organização na formação do espectro de mutantes ocorre o erro-catástrofe (Domingo et al., 1999). Outro aspecto importante é o desempenho biológico (*fitness*) que pode ser definido como a capacidade replicativa viral total, ou seja, sua adaptação, em um determinado ambiente. O desempenho relativo pode ser quantificado por meio de experimentos de competição com vírus de referência (Domingo e Holland, 1997). O desempenho biológico aumenta de forma exponencial conforme a população viral é subcultivada em células, mas é limitado, atingindo um *plateau*, após prolongadas passagens de altos títulos virais (2×10^5 unidades infecciosas em 2×10^6 células) em cultura de células (Novella et al., 1995). favorecendo a população com alto desempenho (Novella et al., 1999). Já o efeito *bottleneck*, ocasionado por transferências repetitivas de unidades formadoras de placas (u.f.p.), pode contribuir para perda de desempenho biológico (Yuste et al., 1999) devido ao aumento de acumulações deletérias (Domingo et al., 1994).

As quasispecies representam também a memória molecular, ou seja, o passado evolutivo da população viral, o que implica em uma reposta populacional mais rápida às pressões seletivas devido ao arsenal gênico mantido pelas sequências em minoria (Ruiz-Jarabo et al., 2000). A memória pode ser durável, podendo ser detectada após 100 ciclos infecciosos em condições controladas, além de ser dependente do desempenho biológico (Ruiz-Jarabo et al., 2002).

Passagens de vírus de RNA em cultura celular podem gerar variações antigênicas e sendo assim, a seleção positiva dessas variantes não depende necessariamente da pressão imunológica (Domingo et al., 1994). O desempenho biológico viral pode influenciar na seleção de quasispecies por AcMs, o que foi demonstrado para FMDV. Isto sugere que qualquer tipo de seleção relativa ao desempenho biológico viral pode fazer com que a variante que se torna dominante participe dos ciclos de replicação e transmissão ao hospedeiro (Martín et al., 2006). Mutações no gene *env* do HIV podem fazer com que o vírus seja resistente a anticorpos neutralizantes autólogos (Mahalanabis et al., 2009). Mutações no envelope viral dos HCV também podem ser selecionadas por AcMs (Gal-Tanamy et al., 2008).

A análise de quasispecies pode ser realizada utilizando clones biológicos ou moleculares. Na maioria das vezes, os clones biológicos são obtidos pelo método de plaqueamento que consiste em realizar diluições virais seriadas e acrescentar um meio semi-sólido, contendo nutrientes do meio de cultura e agente solidificante, como ágar ou agarose, por exemplo, após a adsorção viral (Arias et al., 2001). A técnica de plaqueamento viral foi desenvolvida por Dulbecco em 1962, e é utilizada até os dias de hoje. O ensaio é baseado no conceito de que teoricamente apenas uma partícula viral penetra na célula e ao encontrar uma barreira, no caso o meio semi-sólido, não consegue se dispersar e se replica pontualmente formando as u.f.p. Tendo em vista esse conceito uma u.f.p é originada de uma única partícula viral, o que permite a quantificação do vírus estoque (Lenette et al., 1995). No caso do HRSV, as principais aplicações do ensaio são a quantificação (McKimm-Breschkin et al., 2004) e a purificação viral (García-Barreno et al., 1989; Herlocher et al., 1999; Zhao et al., 2006) e. Entretanto, o pequeno tamanho das unidades formadoras de placas (u.f.p) do HRSV dificulta a realização do ensaio (Murphy et al., 1990; Bukreyev et al., 1997; McKimm-Breschkin et al., 2004). Tendo em vista que as u.f.p são pequenas, a revelação por métodos sorológicos tende a ser necessária, o que gera outra dificuldade em termos de custo e devido à variabilidade genética, já que o HRSV pode não ser reconhecido pelos anticorpos utilizados na reação (McKimm-Breschkin et al., 2004). Os clones moleculares são geralmente obtidos pelo método de clonagem de genes amplificados pela técnica de PCR (reação em cadeia pela polimerase) em plasmídeos bacterianos. Posteriormente à execução destes métodos prossegue-se com a reação de sequenciamento da região gênica de interesse (Arias et al., 2001). Métodos de bioinformática têm sido desenvolvidos para auxiliar na detecção de quasispecies como, por exemplo, o LOCQSPEC (Localizador de Quasispecies), que compara um conjunto de sequências e baseando-se nas divergências entre elas, avalia a diversidade das quasispecies (Marucci et al., 2008).

Estudos sobre quasispecies de amostras clínicas de RSV *in vitro* envolvendo alterações de nucleotídeos das proteínas F e G em subcultivos celulares são raros. Existe apenas um estudo envolvendo a glicoproteína G de BRSV (Deplanche et al., 2007). Além disso, não há estudos envolvendo a seleção das possíveis quasispecies, presentes em amostras clínicas, pelo soro da criança colhido na fase aguda e pelo soro da mãe. As regiões G2 e F2 são variáveis, podendo talvez ser mais susceptíveis à alterações dentro da mesma população. Visando esclarecer alguns mecanismos moleculares e a relação destes com o escape imunológico do vírus, os principais objetivos deste trabalho forma verificar a existência de

alterações genéticas em regiões variáveis correspondentes às proteínas G e F do HRSV, na ausência e na presença de anticorpos policlonais e se mutantes pré-existent na população viral são selecionados na presença de soro humano.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As amostras clínicas colhidas em 1998 escolhidas para o estudo, apresentaram sincícios em cultura de células HEp-2 e a positividade foi confirmada por IFI e PCR.

Todos os soros apresentaram anticorpos neutralizantes de classe IgG para HRSV presente nas amostras virais correspondentes, o que foi verificado por reação de IFI e posteriormente por plaquemanento.

A técnica de plaqueamento viral se mostrou adequada à detecção de quasispecies virais, possibilitando a verificação da viabilidade dos mutantes encontrados em cultura de células. A escolha das células, do meio, do agente solidificante e do método de revelação para quantificação parecem ser fundamentais para execução dos ensaios de placa. Células Vero, meio D-MEM/F12, agarose LMP e revelação por reação de imunoperoxidase atenderam de forma mais adequada aos objetivos deste trabalho. Além disso, a inoculação direta das U.F.P. em células HEp-2 recém repicadas possibilitou a recuperação de um número maior de clones.

A maioria das curvas de soroneutralização não apresentou um perfil coincidente com a presença de mutantes de escape, com exceção da amostra Br98-83 frente ao SM. Este padrão de curva é difícil de ser obtido com a utilização de anticorpos policlonais provenientes de soros humanos. Ainda assim, as curvas foram necessárias para verificação da maior concentração de soro na qual U.F.P. ainda estavam presentes para coleta dos clones.

Quatro mutações foram encontradas em sequencias da região G2 de clones do HRSV na ausência de anticorpos neutralizantes, sendo duas sinonimas e duas não-sinonimas, sendo as últimas no mesmo nucleotídeo. Uma alteração não-sinonima no peptídeo sinal do gene F do HRSV foi encontrada em um dos clones sequenciados.

Uma alteração não-sinonima foi encontrada região G2 do HRSV em presença de soro policlonal humano, colhido da criança na fase convalescente. Esta alteração ocorreu em um clone proveniente da mesma amostra, e foi idêntica às duas mutações não-

sinonimas verificadas na ausência de anticorpos. Sendo assim, sequencias em menor quantidade presentes na população viral podem ser selecionadas pelo sistema imunológico do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agénbach E, Tiemessen CT, Venter M. Amino acid variation within the fusion protein of respiratory syncytial virus subtype A and B strains during annual epidemics in South Africa. *Virus Genes*. 2005 Mar;30(2):267-78.

Ahmadian G, Chambers P, Easton AJ. Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J Gen Virol*. 1999 Aug;80 (Pt 8):2011-6.

Alwan WH, Openshaw PJ. Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual viral proteins. *Vaccine*. 1993;11(4):431-7.

Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis*. 1985 Apr;151(4):626-33.

Anderson LJ, Parker RA, Strikas RL. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J Infect Dis*. 1990 Apr;161(4):640-6.

Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1991 Apr;163(4):687-92.

Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 May;100(3):221-30. Review.

Arias A, Lázaro E, Escarmís C, Domingo E. Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J Gen Virol*. 2001 May;82(Pt 5):1049-60.

Arnold R, König B, Werchau H, König W. Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells. *Virology*. 2004 Dec 20;330(2):384-97.

Arslanagic E, Matsumoto M, Suzuki K, Nerome K, Tsutsumi H, Hung T. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. *Acta Virol*. 1996 Sep;40(4):209-14.

Arumugham RG, Hildreth SW, Paradiso PR. Evidence that the fusion protein of respiratory syncytial virus exists as a dimer in its native form. *Brief report Arch Virol.* 1989;106(3-4):327-34.

Ausar SF, Rexroad J, Frolov VG, Look JL, Konar N, Middaugh CR. Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. *Mol Pharm.* 2005 Nov-Dec;2(6):491-9.

Bosso, PAR. Ausência de escapes mutantes para o medicamento palivizumab do vírus respiratório sincicial humano (HRSV) circulantes, na cidade de São Paulo durante o ano de 2004 [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Botosso VF. Diversidade genética da glicoproteína G do vírus respiratório sincicial humano (HRSV) entre as amostras isoladas na cidade de São Paulo, 1995-1998 [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2001.

Botosso VF, Zanutto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TC, Jamal LF, Pardini MI, Pinho JR, Massad E, Sant'anna OA, Holmes EC, Durigon EL; VGDN Consortium. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog.* 2009 Jan;5(1):e1000254.

Brandenburg AH, Groen J, van Steensel-Moll HA, Claas EC, Rothbarth PH, Neijens HJ, Osterhaus AD. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J Med Virol.* 1997 May;52(1):97-104.

Branigan PJ, Day ND, Liu C, Gutshall LL, Melero JA, Sarisky RT, Del Vecchio AM. The cytoplasmic domain of the F protein of Human respiratory syncytial virus is not required for cell fusion. *J Gen Virol.* 2006 Feb;87(Pt 2):395-8.

Brouard J, Freymuth F, Constantini S, Petitjean J, de Schrevel G, Duhamel JF. [Prevalence and clinical aspects of A and B subgroups of respiratory syncytial virus infection. Observation of 8 consecutive epidemics between 1982 and 1990] *Arch Fr Pediatr.* 1993 Oct;50(8):639-43.

Bueno Campaña M, Calvo Rey C, Vázquez Alvarez MC, Parra Cuadrado E, Molina Amores C, Rodrigo García G, Echávarri Olavarria F, Valverde Cánovas J, Casas Flecha I. [Viral respiratory tract infections in the first six months of life] *An Pediatr (Barc).* 2008 Nov;69(5):400-5.

Bueno SM, González PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, Mora JE, Prado CE, Zúñiga JP, Jiménez J, Riedel CA, Kalergis AM. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2008 Oct;8(10):1320-9. Review.

Bukreyev A, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol*. 1997 Dec;71(12):8973-82.

Bukreyev A, Serra ME, Laham FR, Melendi GA, Kleeberger SR, Collins PL, Polack FP. The cysteine-rich region and secreted form of the attachment G glycoprotein of respiratory syncytial virus enhance the cytotoxic T-lymphocyte response despite lacking major histocompatibility complex class I-restricted epitopes. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):5854-61.

Campos ACA, Durigon EL, Leal AL, Silva TS, Bosso PAR, Moraes CTP, Oliveira DBL, Lima HN, Vieira SE, Botosso VF, Zanotto PMA, Stewien KE. Comparison between ectodomain and G2 region of G glycoprotein for genotyping of HRSV. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38:413-416.

Candeias JA. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1967 Jan-Feb;9(1):27-30.

Cane PA, Pringle CR. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol*. 1991 Feb;72 (Pt 2):349-57.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol*. 1994 Jan;32(1):1-4.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Frequent polymerase errors observed in a restricted area of clones derived from the attachment (G) protein gene of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1993 Feb;67(2):1090-3.

Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*. 2001 Mar-Apr;11(2):103-16. Review.

Chanock RM. Recovery of a new type of myxovirus from infants with croup. *Ann N Y Acad Sci*. 1957 Apr 19;67(8):287-95.

Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 1957 Nov;66(3):291-300.

Checon RE, Siqueira MM, Lugon AK, Portes S, Dietze R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Nov;67(5):490-1.

Cintra OA, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LT, Rocha GM, Siqueira MM, Arruda E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. *J Med Virol.* 2001 Oct;65(2):408-12.

Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Am J Epidemiol.* 1966 Mar;83(2):299-313.

Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol.* 1998.

Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Dec;81(24):7683-7.

Collins PL, Mottet G. Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J Gen Virol.* 1992 Apr;73 (Pt 4):849-63.

Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1993 Jul;74 (Pt 7):1445-50.

Collins PL, McIntosh K, Chanock RM. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Raven Publishers; 1996.p.1313-51.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 4nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Raven Publishers; 2001.p.1443-85.

Collins PL, Crowe Jr JE. Respiratory Syncytial Virus. In: Knipe DM, Howley PM, Fields virology. 5nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Raven Publishers; 2007.p.1602-40.

Collins RA, Gualano RC, Zosky GR, Chiappetta CL, Turner DJ, Colasurdo GN, Hantos Z, Sly PD. Lack of long-term effects of respiratory syncytial virus infection on airway function in mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007 Jun 15;156(3):345-52.

Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*. 2008 Mar;82(5):2040-55. Review.

Corsello G, Di Carlo P, Salsa L, Gabriele B, Meli L, Bruno S, Titone L. Respiratory syncytial virus infection in a Sicilian pediatric population: risk factors, epidemiology, and severity. *Allergy Asthma Proc*. 2008 Mar-Apr;29(2):205-10.

Cox MJ, Azevedo RS, Cane PA, Massad E, Medley GF. Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in São Paulo state, Brazil. *J Med Virol*. 1998 Jul;55(3):234-9.

Crim RL, Audet SA, Feldman SA, Mostowski HS, Beeler JA. Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J Virol*. 2007 Jan;81(1):261-71.

Cristina J, Yunus AS, Rockemann DD, Samal SK. Genetic analysis of the G and P genes in ungulate respiratory syncytial viruses by RNase A mismatch cleavage method. *Vet Microbiol*. 1998 Jul;62(3):185-92.

Darwin, C. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* 6th ed Darwin. Published by MobileReference. Kindle Edition: mai; 2008

da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. *J Med Virol*. 2008 Sep;80(9):1653-60.

Day ND, Branigan PJ, Liu C, Gutshall LL, Luo J, Melero JA, Sarisky RT, Del Vecchio AM. Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. *Virol J*. 2006 May 24;3:34.

de Sierra M, Arbiza J. Genetic stability of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial viruses during serial passages in cell cultures. *Acta Virol*. 2004;48(2):115-21.

Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, Diaz L, Trento A, Chang HY, Mitzner W, Ravetch J, Melero JA, Irusta PM, Polack FP. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med*. 2009 Jan;15(1):34-41.

Deplanche M, Lemaire M, Mirandette C, Bonnet M, Schelcher F, Meyer G. In vivo evidence for quasispecies distributions in the bovine respiratory syncytial virus genome. *J Gen Virol*. 2007 Apr;88(Pt 4):1260-5.

Domingo E, Díez J, Martínez MA, Hernández J, Holguín A, Borrego B, Mateu MG. New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J Gen Virol*. 1993 Oct;74 (Pt 10):2039-45. Review. Erratum in: *J Gen Virol* 1994 Apr;75(Pt 4):949.

Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-78. Review.

Domingo E, Escarmís C, Menéndez-Arias L, Holland JJ. Viral quasispecies and fitness variations. In: Domingo E, Webster RG, Holland JF *Origin and Evolution of Viruses*. San Diego: Academic Press jun; 1999.p.141-61.

Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutiérrez-Riva M, Menéndez-Arias L. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res*. 2001;57:77-115.

Domingo E, Wain-Hobson S. The 30th anniversary of quasispecies. Meeting on Quasispecies: past, present and future'. *EMBO Rep*. 2009 May;10(5):444-8.

Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1952 Aug;38(8):747-52.

Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, Valentini M, Bernini L, Cellesi C, Cusi MG. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy. *J Med Virol*. 2009 Apr;81(4):750-6.

Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in older persons. *Vaccine*. 1998 Nov;16(18):1775-8. Review.

Fearns R, Peeples ME, Collins PL. Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2002 Feb;76(4):1663-72.

Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6610-7.

Feldman SA, Crim RL, Audet SA, Beeler JA. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. *Arch Virol*. 2001 Dec;146(12):2369-83.

Fleming EH, Kolokoltsov AA, Davey RA, Nichols JE, Roberts NJ Jr. Respiratory syncytial virus F envelope protein associates with lipid rafts without a requirement for other virus proteins. *J Virol*. 2006 Dec;80(24):12160-70.

Fodha I, Vabret A, Ghedira L, Seboui H, Chouchane S, Dewar J, Gueddiche N, Trabelsi A, Boujaafar N, Freymuth F. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *J Med Virol*. 2007 Dec;79(12):1951-8.

Fodha I, Vabret A, Bouslama L, Leroux M, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Dewar J, Trabelsi A, Boujaafar N, Freymuth F. Molecular diversity of the aminoterminal region of the G protein gene of human respiratory syncytial virus subgroup B. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Mar;56(2):50-7.

Freshney, R. Ian Culture of animal cells : a manual of basic technique 4th ed New York : Wiley: 2000, 577 p.

Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol*. 2007 Aug;81(15):8361-6.

Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2266-73.

Gal-Tanamy M, Keck ZY, Yi M, McKeating JA, Patel AH, Fountg SK, Lemon SM. In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19450-5.

García O, Martín M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Breña P, Martínez I, García-Barreno B, et al. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus

(subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol.* 1994 Sep;68(9):5448-59. *Methods Mol Biol.* 2007;379:109-25. Review.

Garcia-Barreno B, Jorcano JL, Aukenbauer T, López-Galíndez C, Melero JA. Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus (RSV). *Virus Res.* 1988 Mar;9(4):307-21.

García-Barreno B, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Perez-Breña P, Melero JA. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol.* 1989 Feb;63(2):925-32.

García-Barreno B, Portela A, Delgado T, López JA, Melero JA. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *EMBO J.* 1990 Dec;9(12):4181-7.

Gimenez HB, Cash P, Melvin WT. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *J Gen Virol.* 1984 May;65 (Pt 5):963-71.

Gimenez HB, Hardman N, Keir HM, Cash P. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. *J Gen Virol.* 1986 May;67 (Pt 5):863-70.

Graham BS, Johnson TR, Peebles RS. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology.* 2000 Jul 25;48(3):237-47. Review.

Graham BS, Rutigliano JA, Johnson TR. Respiratory syncytial virus immunobiology and pathogenesis. *Virology.* 2002 May 25;297(1):1-7. Review.

Groothuis JR, Gutierrez KM, Lauer BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* 1988 Aug;82(2):199-203.

Gutiérrez-Ortega A, Sánchez-Hernández C, Gómez-García B. Respiratory syncytial virus glycoproteins uptake occurs through clathrin-mediated endocytosis in a human epithelial cell line. *Virol J.* 2008 Oct 25;5:127. Review.

Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1980 Jan;141(1):98-102.

Hall CB, Douglas RG Jr. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr*. 1981 Jul;99(1):100-3.

Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis*. 1990 Dec;162(6):1283-90.

Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis*. 2001 Sep 15;33(6):792-6.

Hallak LK, Collins PL, Knudson W, Peeples ME. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 2000 Jun 5;271(2):264-75.

Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10508-13.

Hallak LK, Kwilas SA, Peeples ME. Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods Mol Biol*. 2007;379:15-34. Review.

Harcourt J, Alvarez R, Jones LP, Henderson C, Anderson LJ, Tripp RA. Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1600-8.

Hawthorne JD, Albrecht P. Sensitive plaque neutralization assay for parainfluenza virus types 1, 2, and 3 and respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*. 1981 Apr;13(4):730-7.

Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG, Gustafson E, Bernstein JM, Galinski MS. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology*. 1994 May 1;200(2):801-5.

Hendry RM, Burns JC, Walsh EE, Graham BS, Wright PF, Hemming VG, Rodriguez WJ, Kim HW, Prince GA, McIntosh K, et al. Strain-specific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1988 Apr;157(4):640-7.

Herlocher ML, Ewasyshyn M, Sambhara S, Gharaee-Kermani M, Cho D, Lai J, Klein M, Maassab HF. Immunological properties of plaque purified strains of live attenuated respiratory syncytial virus (RSV) for human vaccine. *Vaccine*. 1999 Jan;17(2):172-81.

Hillis WD, Cooper MR, Bang FB, Dey AK, Shah KV. Respiratory syncytial virus infection in children in West Bengal. *Indian J Med Res*. 1971 Sep;59(9):1354-64.

Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;176:1-20. Review.

Hornsleth A, Bech-Thomsen N, Friis B. Detection of RS-virus IgG-subclass-specific antibodies: variation according to age in infants and small children and diagnostic value in RS-virus-infected small infants. *J Med Virol*. 1985 Aug;16(4):329-35.

Huang YT, Wertz GW. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol*. 1982 Jul;43(1):150-7.

Imaz MS, Sequeira MD, Videla C, VEROnessi I, Cociglio R, Zerbini E, Carballal G. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *J Med Virol*. 2000 May;61(1):76-80.

International Committee on Taxonomy of Viruses. Paramyxoviruses. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey> [2008]

Ison MG, Hayden FG. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr Opin Infect Dis*. 2002 Aug;15(4):355-67. Review.

Jardim AC, Yamasaki LH, de Queiróz AT, Bittar C, Pinho JR, Carareto CM, Rahal P, Mello IM. Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with Peginterferon and Ribavirin. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):689-98.

Johnson PR Jr, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL. 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*. 1987 Oct;61(10):3163-6.

Kamasaki H, Tsutsumi H, Seki K, Chiba S. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup B strain isolated during the last 20 years from the same region in Japan: existence of time-dependent linear genetic drifts. *Arch Virol*. 2001;146(3):457-66.

Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969 Apr;89(4):422-34.

Kim YJ, Boeckh M, Englund JA. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007 Apr;28(2):222-42. Review.

Kim YK, Choi EH, Lee HJ. Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of genotypes of the respiratory syncytial virus. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):820-8.

Kisch AL, Johnson KM. A plaque assay for respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963 Mar;112:583-9.

Kochva U, Leonov H, Arkin IT. Modeling the structure of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein by silent-mutation analysis of global searching molecular dynamics. *Protein Sci*. 2003 Dec;12(12):2668-74.

Kongchanagul A, Suptawiwat O, Kanrai P, Uiprasertkul M, Puthavathana P, Auewarakul P. Positive selection at the receptor-binding site of haemagglutinin H5 in viral sequences derived from human tissues. *J Gen Virol*. 2008 Aug;89(Pt 8):1805-10.

Krusat T, Streckert HJ. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol*. 1997;142(6):1247-54.

Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J Med Virol*. 2005 Jun;76(2):241-7.

Lambert DM. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology*. 1988 Jun;164(2):458-66.

Lambkin R, McLain L, Jones SE, Aldridge SL, Dimmock NJ. Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily selected by antisera from mice immunized with whole virus: a possible mechanism for antigenic drift. *J Gen Virol*. 1994 Dec;75 (Pt 12):3493-502

Langedijk JP, Schaaper WM, Meloen RH, van Oirschot JT. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1996 Jun;77 (Pt 6):1249-57.

Lawless-Delmedico MK, Sista P, Sen R, Moore NC, Antczak JB, White JM, Greene RJ, Leanza KC, Matthews TJ, Lambert DM. Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry.* 2000 Sep 26;39(38):11684-95.

Lazar I, Canaan A, Weibel C, Kahn JS. Novel mutations in the respiratory syncytial virus G gene identified in viral isolates from a girl with severe combined immune deficiency treated with intravenous immune globulin. *J Clin Virol.* 2006 Nov;37(3):168-73.

Lennette, EH., Lennette, DA., Lennette, ET. Diagnostic producer for viral, rickettsial and chlamydial infection. *Am. Pub. Health Assoc.:* 1995.

Leonov SV, Waris M, Norrby E. Linear antigenic and immunogenic regions of human respiratory syncytial virus N protein. *J Gen Virol.* 1995 Feb;76 (Pt 2):357-64.

Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1987 Sep;68 (Pt 9):2521-4.

Lichtenstein DL, Roberts SR, Wertz GW, Ball LA. Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. *J Gen Virol.* 1996 Jan;77 (Pt 1):109-18.

López JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, García-Barreno B, Melero JA. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6922-8.

Low KW, Tan T, Ng K, Tan BH, Sugrue RJ. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb 8;366(2):308-13.

MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JA. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. *N Engl J Med.* 1982 Aug 12;307(7):397-400.

Mackie PL, Joannidis PA, Beattie J. Evaluation of an acute point-of-care system screening for respiratory syncytial virus infection. *J Hosp Infect.* 2001 May;48(1):66-71.

Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev*. 2003 Jun;4(2):84-90. Review.

Mahalanabis M, Jayaraman P, Miura T, Pereyra F, Chester EM, Richardson B, Walker B, Haigwood NL. Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naïve human immunodeficiency virus controllers. *J Virol*. 2009 Jan;83(2):662-72.

Malet I, Delelis O, Soulie C, Wirdein M, Tchertanov L, Mottaz P, Peytavin G, Katlama C, Mouscadet JF, Calvez V, Marcelin AG. Quasispecies variant dynamics during emergence of resistance to raltegravir in HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr;63(4):795-804.

Mallipeddi SK, Samal SK. Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV. *J Gen Virol*. 1993 Dec;74 (Pt 12):2787-91.

Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, Couderc L, Siret D, Donnou MD, Bubenheim M, Vabret A, Freymuth F. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One*. 2009;4(2):e4596.

Marsh R, Connor A, Gias E, Toms GL. Increased susceptibility of human respiratory syncytial virus to neutralization by anti-fusion protein antibodies on adaptation to replication in cell culture. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):829-37.

Martín D, Calder LJ, García-Barreno B, Skehel JJ, Melero JA. Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity. *J Gen Virol*. 2006 Jun;87(Pt 6):1649-58.

Martín V, Perales C, Dávila M, Domingo E. Viral fitness can influence the repertoire of virus variants selected by antibodies. *J Mol Biol*. 2006 Sep 8;362(1):44-54.

Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis*. 2002 Sep 15;186(6):839-42.

Martínez I, Dopazo J, Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol*. 1997 Oct;78 (Pt 10):2419-29.

Martínez I, Melero JA. Enhanced neutralization of human respiratory syncytial virus by mixtures of monoclonal antibodies to the attachment (G) glycoprotein. *J Gen Virol.* 1998 Sep;79 (Pt 9):2215-20.

Martínez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol.* 2000 Nov;81(Pt 11):2715-22.

Marucci EA, Zafalon GF, Jardim AC, Yamasaki LH, Bittar C, Rahal P, Machado JM. Routine libraries for pattern recognition in quasispecies. *Genet Mol Res.* 2008 Sep 30;7(3):970-81.

McConnochie KM, Hall CB, Walsh EE, Roghmann KJ. Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype. *J Pediatr.* 1990 Jul;117(1 Pt 1):52-62.

McIntosh ED, De Silva LM, Oates RK. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sydney, Australia. *Pediatr Infect Dis J.* 1993 Oct;12(10):815-9.

McIntosh K, Chanock R.M. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN, Knipe DM. *Fields virology.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1990.p.1045-72.

McKimm-Breschkin JL. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus--direct visualization of plaques without immunostaining. *J Virol Methods.* 2004 Sep 1;120(1):113-7.

Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol.* 1997 Oct;78 (Pt 10):2411-8. Review.

Millichap JJ, Wainwright MS. Neurological Complications of Respiratory Syncytial Virus Infection: Case Series and Review of Literature. *J Child Neurol.* 2009 Mar 4.

Montieri S, Puzelli S, Ciccozzi M, Calzoletti L, Di Martino A, Milia MG, Rossi A, Piro F, Rezza G, Donatelli I. Amino acid changes in the attachment G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses (subgroup A) isolated in Italy over several epidemics (1997-2006). *J Med Virol.* 2007 Dec;79(12):1935-42.

Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, Ramos EA, Siqueira MM, Arbiza J. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. *J Med Virol.* 2004 Sep;74(1):156-60.

Muelenaer PM, Henderson FW, Hemming VG, Walsh EE, Anderson LJ, Prince GA, Murphy BR. Group-specific serum antibody responses in children with primary and recurrent respiratory syncytial virus infections. *J Infect Dis.* 1991 Jul;164(1):15-21.

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1985 Oct;66 (Pt 10):2111-24.

Murphy BR, Sotnikov AV, Lawrence LA, Banks SM, Prince GA. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization. *Vaccine.* 1990 Oct;8(5):497-502.

Nascimento JP, Siqueira MM, Suttmoller F, Krawczuk MM, de Farias V, Ferreira V, Rodrigues MJ. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991 Jul-Aug;33(4):287-96.

Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3675-8.

Nokes JD, Cane PA. New strategies for control of respiratory syncytial virus infection. *Nokes JD, Cane PA. Curr Opin Infect Dis.* 2008 Dec;21(6):639-43. Review.

Novella IS, Duarte EA, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 20;92(13):5841-4.

Novella IS, Quer J, Domingo E, Holland JJ. Exponential fitness gains of RNA virus populations are limited by bottleneck effects. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1668-71.

Nowak, M. A. May RM. *Virus dynamics : mathematical principles of immunology and virology.* New York : Oxford University Press; 2000.p.83-9.

Noyola DE, Mandeville PB. Effect of climatological factors on respiratory syncytial virus epidemics. *Epidemiol Infect.* 2008 Oct;136(10):1328-32.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S119-26. Review.

Oliveira DB, Durigon EL, Carvalho AC, Leal AL, Souza TS, Thomazelli LM, Moraes CT, Vieira SE, Gilio AE, Stewien KE. Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. *J Med Virol*. 2009 May;81(5):915-21.

Oliveira TF, Freitas GR, Ribeiro LZ, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SA, Silveira HL, Calegari T, Costa LF, Mantese OC, Queiróz DA. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Aug;103(5):417-22.

Östlund MR, Lindell AT, Stenler S, Riedel HM, Wirgart BZ, Grillner L. Molecular epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002-2003. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):159-67.

Palomo C, Cane PA, Melero JA. Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: influence of strain variation and carbohydrate side chains. *Med Virol*. 2000 Apr;60(4):468-74.

Parveen S, Broor S, Kapoor SK, Fowler K, Sullender WM. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. *J Med Virol*. 2006 May;78(5):659-65.

Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3055-64.

Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, Ueda M, Matsumoto TK, Durigon EL. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis*. 2008 Dec;12(6):476-9.

Perales C, Agudo R, Domingo E. Counteracting quasispecies adaptability: extinction of a ribavirin-resistant virus mutant by an alternative mutagenic treatment. *PLoS One*. 2009;4(5):e5554.

Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol*. 1998 Sep;79 (Pt 9):2221-9.

Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis.* 2000 Jun;181(6):1891-6.

Polack FP, Irusta PM, Hoffman SJ, Schiatti MP, Melendi GA, Delgado MF, Laham FR, Thumar B, Hendry RM, Melero JA, Karron RA, Collins PL, Kleeberger SR. The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 21;102(25):8996-9001.

Plows DJ, Pringle CR. Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes.* 1995;11(1):37-45.

Queiróz DA, Durigon EL, Botosso VF, Ejzemberg B, Vieira SE, Mineo JR, Yamashita C, Hein N, Lopes CL, Cacharo AL, Stewien KE. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Oct;35(10):1183-93.

Quer J, Hershey CL, Domingo E, Holland JJ, Novella IS. Contingent neutrality in competing viral populations. *J Virol.* 2001 Aug;75(16):7315-20.

Rawling J, Melero JA. The use of monoclonal antibodies and lectins to identify changes in viral glycoproteins that are influenced by glycosylation: the case of human respiratory syncytial virus attachment (G) glycoprotein. *Methods Mol Biol.* 2007;379:109-25. Review.

Reiche J, Schweiger B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1800-10.

Rixon HW, Brown C, Brown G, Sugrue RJ. Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cells. *J Gen Virol.* 2002 Jan;83(Pt 1):61-6.

Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol.* 1994 Jul;68(7):4538-46.

Roca A, Loscertales MP, Quintó L, Pérez-Breña P, Vaz N, Alonso PL, Saiz JC. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in Mozambique: identification of a new cluster of group B isolates. *J Gen Virol.* 2001 Jan;82(Pt 1):103-11.

Roca A, Quintó L, Abacassamo F, Loscertales MP, Gómez-Olivé FX, Fenwick F, Cane PA, Saiz JC, Toms G, Alonso PL. Antibody response after RSV infection in children younger than 1 year of age living in a rural area of Mozambique. *J Med Virol.* 2003 Apr;69(4):579-87.

Routledge EG, Willcocks MM, Morgan L, Samson AC, Scott R, Toms GL. Expression of the respiratory syncytial virus 22K protein on the surface of infected HeLa cells. *J Gen Virol.* 1987 Apr;68 (Pt 4):1217-22.

Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ.* 2008 May;86(5):408-16.

Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, García-Barreno B. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J Virol.* 1991 Jun;65(6):3374-8.

Rueda P, García-Barreno B, Melero JA. Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations). *Virology.* 1994 Feb;198(2):653-62.

Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmís C, Domingo E. Memory in viral quasispecies. *J Virol.* 2000 Apr;74(8):3543-7.

Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Molina-París C, Briones C, Baranowski E, Escarmís C, Domingo E. Duration and fitness dependence of quasispecies memory. *J Mol Biol.* 2002 Jan 18;315(3):285-96.

Russi JC, Chiparelli H, Montano A, Etorena P, Hortal M. Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. *Lancet.* 1989 Oct 28;2(8670):1039-40.

Sakurai H, Williamson RA, Crowe JE, Beeler JA, Poignard P, Bastidas RB, Chanock RM, Burton DR. Human antibody responses to mature and immature forms of viral envelope in respiratory syncytial virus infection: significance for subunit vaccines. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2956-62.

Sanz MC, Kew OM, Anderson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Virus Res.* 1994 Sep;33(3):203-17.

Sarmiento RE, Arias CF, Méndez E, Gómez B. Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein. *Virus Res.* 2009 Jan;139(1):39-47.

Satake M, Coligan JE, Elango N, Norrby E, Venkatesan S. Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids Res.* 1985 Nov 11;13(21):7795-812.

Schlender J, Zimmer G, Herrler G, Conzelmann KK. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol.* 2003 Apr;77(8):4609-16.

Scopes GE, Watt PJ, Lambden PR. Identification of a linear epitope on the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1990 Jan;71 (Pt 1):53-9.

Shinoff JJ, O'Brien KL, Thumar B, Shaw JB, Reid R, Hua W, Santosham M, Karron RA. Young infants can develop protective levels of neutralizing antibody after infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 2008 Oct 1;198(7):1007-15.

Sugrue RJ. Interactions between respiratory syncytial virus and the host cell: opportunities for antiviral strategies? *Expert Rev Mol Med.* 2006 Sep 5;8(21):1-17. Review.

Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol.* 1991 Oct;65(10):5425-34.

Sullender WM, Edwards KG. Mutations of respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G associated with resistance to neutralization by primate polyclonal antibodies. *Virology.* 1999 Nov 10;264(1):230-6.

Sutmöller F, Ferro ZP, Asensi MD, Ferreira V, Mazzei IS, Cunha BL. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. *Clin Infect Dis.* 1995 Apr;20(4):854-60.

Takahashi VNO. Correlação entre os tipos A e B de vírus respiratório sincicial humano (HRSV) e a gravidade das infecções respiratórias em crianças [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2001.

Tang RS, Spaete RR, Thompson MW, MacPhail M, Guzzetta JM, Ryan PC, Reisinger K, Chandler P, Hilty M, Walker RE, Gomez MM, Losonsky GA. Development of a PIV-vectored RSV vaccine: preclinical evaluation of safety, toxicity, and enhanced disease and initial clinical testing in healthy adults. *Vaccine.* 2008 Nov 25;26(50):6373-82.

Taylor CE, Morrow S, Scott M, Young B, Toms GL. Comparative virulence of respiratory syncytial virus subgroups A and B. *Lancet.* 1989 Apr 8;1(8641):777-8.

Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol*. 2001 Aug;75(15):6825-34.

Teng MN, Whitehead SS, Collins PL. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*. 2001 Oct 25;289(2):283-96.

Teng MN, Collins PL. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol*. 2002 Jun;76(12):6164-71.

Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, Gillio AE, Stwien KE, Erdman DD, Durigon EL. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Sep-Oct;83(5):422-8.

Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol*. 2003 Nov;84(Pt 11):3115-20.

Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol*. 2006 Jan;80(2):975-84.

Trépanier P, Payment P, Trudel M. A simple and rapid microassay for the titration of human respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*. 1980;1(6):343-7.

Tripp RA, Alvarez R, Anderson B, Jones L, Weeks C, Chen W. Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(1):117-24.

Tripp RA. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol*. 2004;17(2):165-81. Review.

Tsutsumi H, Matsuda K, Yamazaki H, Ogra PL, Chiba S. Different kinetics of antibody responses between IgA and IgG classes in nasopharyngeal secretion in infants and children during primary respiratory syncytial virus infection. *Acta Paediatr Jpn*. 1995 Aug;37(4):464-8.

Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, Suzich J, McCarthy MP. Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *J Gen Virol*. 2008 Dec;89(Pt 12):3113-8.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo M^a, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 2000, 1167pp.

Varga SM, Wissinger EL, Braciale TJ. The attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus contains a single immunodominant epitope that elicits both Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6487-95.

Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol*. 2001 Sep;82(Pt 9):2117-24.

Vieira SE, Gilio AE, Durigon EL, Ejzenberg B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007 Dec;62(6):709-16.

Visser A, Delpont S, Venter M. Molecular epidemiological analysis of a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus associated pneumonia in a kangaroo mother care unit in South Africa. *J Med Virol*. 2008 Apr;80(4):724-32.

Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol*. 1983 Jul;47(1):171-7.

Walsh EE, Brandriss MW, Schlesinger JJ. Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J Gen Virol*. 1985 Mar;66 (Pt 3):409-15.

Walsh EE, Hall CB, Schlesinger JJ, Brandriss MW, Hildreth S, Paradiso P. Comparison of antigenic sites of subtype-specific respiratory syncytial virus attachment proteins. *J Gen Virol*. 1989 Nov;70 (Pt 11):2953-61.

Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis*. 1997 Apr;175(4):814-20.

Walsh EE, Falsey AR, Sullender WM. Monoclonal antibody neutralization escape mutants of respiratory syncytial virus with unique alterations in the attachment (G) protein. *J Gen Virol*. 1998 Mar;79 (Pt 3):479-87.

Wang F, Wang H, Shen H, Meng C, Weng X, Zhang W. Evolution of hepatitis B virus polymerase mutations in a patient with HBeAg-positive chronic hepatitis B virus treated with sequential monotherapy and add-on nucleoside/nucleotide analogues. *Clin Ther*. 2009 Feb;31(2):360-6.

Ward KA, Everson JS, Lambden PR, Watt PJ. Antigenic and structural variation in the major nucleocapsid protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 1984 Oct;65 (Pt 10):1749-57.

Weber A, Weber M, Milligan P. Modeling epidemics caused by respiratory syncytial virus (RSV). *Math Biosci*. 2001 Aug;172(2):95-113.

Weisman LE. Motavizumab, a second-generation humanized mAb for the prevention of respiratory syncytial virus infection in high-risk populations. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Apr;11(2):208-18.

Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun;82(12):4075-9.

Woelk CH, Holmes EC. Variable immune-driven natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV). *J Mol Evol*. 2001 Feb;52(2):182-92.

Yeo DS, Chan R, Brown G, Ying L, Sutejo R, Aitken J, Tan BH, Wenk MR, Sugrue RJ. Evidence that selective changes in the lipid composition of raft-membranes occur during respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 2009 Mar 30;386(1):168-82.

Yui I, Hoshi A, Shigeta Y, Takami T, Nakayama T. Detection of human respiratory syncytial virus sequences in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 2003 Jul;70(3):481-9.

Yuste E, Sánchez-Palomino S, Casado C, Domingo E, López-Galíndez C. Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):2745-51.

Zakay-Rones Z, Margalith E, Levy R, Katz E. A sensitive plaque inhibition technique for assay of antibodies to influenza virus: use to detect previous antigenic priming with influenza viruses. *J Virol Methods*. 1980;1(6):355-60.

Zhan X, Slobod KS, Krishnamurthy S, Luque LE, Takimoto T, Jones B, Surman S, Russell CJ, Portner A, Hurwitz JL. Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections. *Vaccine*. 2008 Jun 25;26(27-28):3480-8.

Zhang Y, Xu W, Shen K, Xie Z, Sun L, Lu Q, Liu C, Liang G, Beeler JA, Anderson LJ. Genetic variability of group A and B human respiratory syncytial viruses isolated from 3 provinces in China. *Arch Virol*. 2007;152(8):1425-34.

Zhao X, Sullender WM. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J Virol*. 2005 Apr;79(7):3962-8

Zhao X, Chen FP, Megaw AG, Sullender WM. Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants. *J Infect Dis*. 2004 Dec 1;190(11):1941-6.

Zhao X, Sullender WM. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J Virol*. 2005 Apr;79(7):3962-8.

Zhao X, Liu E, Chen FP, Sullender WM. In vitro and in vivo fitness of respiratory syncytial virus monoclonal antibody escape mutants. *J Virol*. 2006 Dec;80(23):11651-7.

Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*. 1996 Feb;34(2):334-7.

Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment g glycoprotein. *J Virol*. 2004 May;78(9):4675-83.

Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol*. 2005 Jul;79(14):9157-67.