Ana Priscila Perini

Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3,
identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário
da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/ IPT, para a obtenção de título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2012

Ana Priscila Perini

**Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3,
identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário
da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/ IPT, para a obtenção de título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Perini, Ana Priscila.

Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005 / Ana Priscila Perini. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vírus respiratórios.

Versão do título para o inglês: Genetic diversity of Parainfluenza virus 1, 2 and 3, identified from samples taken at the University Hospital of São Paulo University, during 1995 to 2005.

1. Virologia 2. *Paramyxoviridae* 3. Sequenciamento genético
4. Doenças infecciosas 5. Epidemiologia I. Botosso, Profa. Dra. Viviane Fongaro II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0131/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Ana Priscila Perini.

Título da Tese: Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005.

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de agosto de 2008.

PARECER 853/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 87ª reunião realizada em 25.08.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Estudo da diversidade genética dos vírus Parainfluenza 1, 2, e 3, durante os anos de 1995 e 2005, em amostras colhidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, condicionada ao registro das coleções de amostras envolvida neste projeto, conforme Resolução 347/05, cópia anexo.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25 de agosto de 2009**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
ANA PRISCILA PERINI
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

São Paulo, 29 de setembro de 2008.

Ref: Projeto 2008/021

Caro Dra. Ana Perini,

Segue o parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fleury sobre o projeto intitulado "Estudo da diversidade genética dos vírus Parainfluenza 1,2 e 3, durante os anos de 1995 e 2005 em amostras colhidas no Hospital Universitário de São Paulo" número CEP Instituto 2008/021.

De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196/96 o projeto foi avaliado por dois relatores e o parecer final é: APROVADO.

Atenciosamente,

Celso Hernandez Granato

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fleury.

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido, Luiz Francisco,
pela compreensão, carinho e paciência.*

*Aos meus tesouros Amanda e o bebe que está chegando, que mesmo sem saber, me
acompanharam nesta caminhada,*

*A meus pais,
José Ricardo Perini e Suely Marinheiro Perini*

Vocês são a fonte de inspiração de tudo que faço, minha razão de viver....

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos....

A Deus, pelo Dom da vida;

Às crianças e aos pais ou responsáveis que tornaram possível a realização desse trabalho;

À minha amiga e orientadora, Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso, pela confiança, amizade e por todas as oportunidades nesses anos de trabalho;

Ao prof. Dr. Edison Luiz Durigon, que abriu a primeira porta, apresentando esse microscópico e apaixonante mundo dos vírus; e contribuindo ao ceder as amostras para a realização deste trabalho;

Ao Instituto Fleury que gentilmente cedeu as cepas de HPIV

À querida amiga Maria Luiza Barbosa (Malu), mesmo com a distância, sempre está presente na minha vida;

À grande amiga Marcia Regina Barros, sempre presente em minha vida;

Aos queridos colegas do Laboratório: Danila Vedovello, César Augusto Dinolá Pereira, Priscila Comone, Patrícia Sacramento, Mariana Durigan.

Aos funcionários da secretaria de pós graduação de Biotecnologia;

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas;

A todos que mesmo sem saber participaram deste trabalho;

RESUMO

PERINI, A. P. **Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005.** 2012. 116 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introdução: Os parainfluenzavirus humanos (HPIVs) são importante causa de infecções respiratórias em bebês, crianças e pacientes imunodeprimidos, tendo uma distribuição mundial. Na população pediátrica a doença característica associada com HPIV-1 e -2 é laringotraqueobronquite (CROUP), mas estes vírus também podem ser responsáveis pela infecção do trato respiratório superior e faringite, enquanto que o HPIV-3 também está associado com a pneumonia e bronquiolite. Estudos de sequenciamento genético envolvendo fragmentos dos genes codificadores das proteínas HN ou F visam obter dados que permitam a compreensão do padrão de circulação e de evolução destes vírus, gerando informações importantes, tanto para o diagnóstico como para o desenvolvimento de vacinas. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi realizar a análise molecular do fragmento do gene da HN dos três tipos de parainfluenzavirus, 1, 2 e 3. **Métodos:** aspirados nasofaríngeos de 2152 lactentes e crianças menores de cinco anos, internados na Universidade de São Paulo Hospital (HU-USP), com doença respiratória aguda foram coletadas de 1995 a 2005. A detecção de HPIV 1, 2 e 3 foi realizada por multiplex RT-PCR utilizando iniciadores específicos para HN gene, marcado com FAM. A seguir um fragmento de gene HN aproximadamente 480 pb da região C terminal foi amplificado, sequenciado e submetido à análise filogenética. **Resultados e discussão:** Um total de 6% (n = 135) das amostras foram positivas para HPIVs, sendo o HPIV-3 o vírus mais frequentemente detectado durante todos os anos estudados, correspondendo a 80 % (108/135) dos casos positivos, seguido por HPIV-1 com 15 % (20/135) e HPIV-2 com 7 % (10/135). A positividade entre os anos estudados variou de 1% (1/195) em 1996 para 18 % (24/154) em 1999. A maioria das mutações observadas nos HPIV-1 e -3 foram silenciosas, no entanto, algumas alterações de aminoácidos foram verificadas em áreas conservadas dos HPIV-3 e HPIV-2, além da verificação de alterações em potenciais sítios de N-glicosilação. A análise filogenética demonstrou uma baixa variabilidade entre as amostras de HPIV-1, com a circulação de apenas 1 genótipo (C), e HPIV-3. A única amostra de HPIV-2 apresentou maior variabilidade comparada à amostra protótipo, no qual verificou-se que 70% das alterações eram não sinônimas.

Palavras-chave: Parainfluenza vírus. PCR. Virologia molecular. Evolução molecular.

ABSTRACT

PERINI, A. P. **Genetic diversity of Parainfluenza virus 1, 2 and 3, identified from samples taken at the University Hospital of São Paulo University, during 1995 to 2005.** 2012. 116 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introduction: Human parainfluenza viruses (HPIVs) are important cause of lower respiratory tract infections in infants, young children and immunocompromised patients, and have a worldwide distribution. In paediatric population the characteristic illness associated with HPIV-1 and -2 is laryngotracheobronchitis, but it can also be responsible for upper respiratory tract infection and pharyngitis, whereas HPIV-3 is also associated with pneumonia and bronchiolitis. Sequencing studies involving encoding genes fragments of HN or F proteins aim to obtain data to allow the understanding of the circulation pattern and evolution of these viruses, generating important information for both diagnosis and for vaccine development. **Objectives:** The aim of this study was to carry out the molecular analysis of the fragment of the HN gene of the parainfluenza 1, 2 and 3. **Methods:** Nasopharyngeal aspirates from 2152 infants and children under five years old, hospitalized at the University of São Paulo Hospital (HU-USP) with acute respiratory illness were collected from 1995 to 2005. The detection of HPIV 1, 2 and 3 were performed by multiplex RT-PCR using specific primers to HN gene, labeled with FAM. The fragment of HN gene (approximately 480 pb from C terminal region) was amplified, sequenced and, subjected to phylogenetic analysis. **Results and discussion:** A total of 6% (n=135) samples were positive for one of the HPIV, and the HPIV-3 was the most frequent virus detected during all years studied, corresponding to 80 % (108/135) of positive cases, followed by HPIV-1 with 15 % (20/135) and HPIV-2 with 7 % (10/135). The positivity among the years studied ranged from 1 % (1/195) in 1996 to 18 % (24/154) in 1999. Most mutations observed in HPIV-1 and HPIV-3 were silent in all HPIVs, however, some amino acids alterations in conserved areas, verified in HPIV-3 and HPIV-2, and alterations in N-glicosilation sites were observed. Phylogenetic analysis showed a lower variability in the HPIV-1 samples, just genotype C was present, and HPIV-3. The single sample of HPIV-2 showed a higher variability compared to prototype sample, in which was found that 70 % of the changes were not synonymous.

Keywords: Parainfluenza vírus. PCR. Molecular virology. Molecular evolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito citopático dos Myxovírus em amostras de crianças com CROUP	20
Figura 2 - Vírus parainfluenza.....	23
Figura 3 - Representação esquemática da proteína F dos Paramyxovirus	28
Figura 4 - Representação da proteína HN do HPIV-3 na forma hexagonal complexada com ácido β -siálico.....	29
Figura 5 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína HN de sete Paramyxovirus [Vírus Sendai; HPIV-1-Washington/1957; HPIV-3-Aus/124854/74; Vírus Simian-5-W3; HPIV-2; Vírus do Sarampo-Miyahara vaccine e Vírus Newcastle-Kansas (NDV)].	30
Figura 6 - Sítio ativo da proteína HN complexado com molécula de ácido siálico em amarelo	32
Figura 7 - Ilustração do ciclo de replicação dos parainfluenzavirus	34
Figura 8 - Representação esquemática da região amplificada do gene HN dos HPIV-1, HPIV-2 e, HPIV-3.....	49
Figura 9 - Esquema da semi-nested PCR utilizada na amplificação das amostras que não foram amplificadas pelo protocolo original.....	52
Figura 10 - Detecção e tipagem das amostras pela <i>multiplex</i> - RT-PCR	55
Figura 11 - Distribuição de HPIV mês a mês durante os anos de 1995 a 2005	57
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 2%, dos produtos da RT-PCR utilizando os <i>primers</i> PIP1, PIP2 e PIP3 para amplificação do gene HN.....	58
Figura 13 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HN de 37 amostras de HPIV-3 obtidas no período de 1995 à 2005	63
Figura 14 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HN de 1 amostra de HPIV-2 obtidas no período de 1995 à 2005.....	66
Figura 15 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HN de 3 amostras de HPIV-1 obtidas no período de 1995 à 2005.....	70

Figura 16 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV-3, Washington_1957_C243(JN089924.1).....	74
Figura 17 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV-2, Greer-J1	75
Figura 18 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV_2_Br_2000_059	76
Figura 19 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV_1_ Washington (acesso GenBank AF457102.1) e das amostras brasileiras	77
Figura 20 - Topologia da árvore obtida pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo <i>Neighbor Joining</i> das amostras brasileiras de HPIV-1	79
Figura 21 - Topologia da árvore obtida pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo <i>Neighbor Joining</i> das amostras brasileiras de HPIV-2	81
Figura 22 - Topologia da árvore obtida pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo <i>Neighbor Joining</i> das amostras brasileiras de HPIV-3	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total de amostras analisadas provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário da USP, número total de amostras positivas para todos os HPIV e para cada um dos HPIVs (HPIV-1, HPIV-2 e, HPIV-3	56
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais proteínas do HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3	25
Quadro 2 - Relação dos <i>primers</i> utilizados na triagem, localização, polaridade, sequência de nucleotídeos e tamanho do amplicon esperado	48
Quadro 3 - Relação dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene da HN, localização, polaridade e sequência de nucleotídeos e tamanho do amplicon	49
Quadro 4 - Principais alterações de nucleotídeos do gene da HN das sequências de HPIV-3 obtidas (nucleotídeos de 717 a 1141) comparadas com a sequência de HN da cepa Walsh (1957).....	59
Quadro 5 - Relação das alterações de aminoácidos da proteína HN de HPIV-3 verificadas nas amostras brasileiras em comparação com a amostra padrão Washington 1957.....	61
Quadro 6 - Principais alterações de nucleotídeos do gene HN verificados na amostra Br_2000_59 de HPIV-2 em comparação com a cepa padrão Greer J-1 (Acesso GenBank AB367954.1)	68
Quadro 7 - Principais alterações de nucleotídeos nas amostras de HPIV-1 amplificadas pela RT-PCR (nucleotídeos de 750 a 1230 do gene da proteína HN).....	72

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

Abreviação	Nome
Ala/A	Alanina
Arg/R	Arginina
Asn/N	Asparagina
Asp/D	Aspartato ou ácido aspártico
Cys/C	Cisteína
Gln/Q	Glutamina
Glu/E	Glutamato o ácido glutâmico
Gly/G	Glicina ou glicocola
His/H	Histidina
Ile/I	Isoleucina
Leu/L	Leucina
Lys/K	Lisina
Met/M	Metionina
Phe/F	Fenilalanina
Pro/P	Prolina
Ser/S	Serina
Thr/T	Treonina
Trp/W	Triptofano
Tyr/Y	Tirosina
Val/V	Valina

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Abreviação	Nome
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido dextroribonucleico
Dntp	Desoxinucleotídeos trifosfatos (do inglês: <i>Dexosynucleosidetriphosphates</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFI	Imunofluorescência Indireta
M	Molar
mL	Mililitro (10^{-3} litro)
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)
mRNA	RNA mensageiro
nt	Nucleotídeos
°C	Graus Celsius
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
Pmol	Picomol (10^{-2} moles)
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
μl	Microlitro (10^{-6} litro)

nm

Nanometro (10^{-9} metro)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Taxonomia e morfologia	21
1.2 Estrutura e organização genômica	22
1.2.1 Proteína de matriz (M)	25
1.2.2 Núcleoproteína (N)	26
1.2.3 Proteína (P)	26
1.2.4 Proteína (L)	26
1.2.5 Proteína (F)	27
1.2.6 Proteína (HN)	28
1.2.7 Proteínas acessórias não estruturais (C,D,V,I)	32
1.3 Replicação	33
1.4 Caracterização antigênica e genética	34
1.5 Patogênese	37
1.6 Clínica e diagnóstico laboratorial	37
1.7 Prevenção e tratamento	39
1.8 Epidemiologia	41
2 OBJETIVOS	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Casuística – amostras de coleção	45
3.2 Colheita das amostras	46
3.3 Extração do RNA total	46
3.4 Obtenção do Cdna	47
3.5 Otimização da <i>multiplex</i> -RT-PCR para a detecção dos parainfluenza 1, 2 e 3 (triagem das amostras)	47
3.6 Otimização da amplificação parcial do gene HN	49
3.7 Detecção dos produtos amplificados	50
3.8 Testes realizados nas amostras não amplificadas pelo protocolo utilizado	51
3.9 Purificação e quantificação dos produtos amplificados	52
3.10 Reação de sequenciamento	53
3.11 Purificação dos produtos amplificados	53
3.12 Processamento e alinhamento das sequências do gene HN	54
3.13 Análise filogenética	54
3.14 Predição dos sítios de N-Glicosilação	54
4 RESULTADOS	55
4.1 Detecção dos vírus parainfluenza 1, 2 e, 3 entre os anos de 1995 a 2005 pela <i>multiplex</i> -RT-PCR	55
4.2 Amplificação parcial do gene da hemaglutinina para o sequenciamento	57
4.3 Análise do sequenciamento parcial do gene da hemaglutinina	58
4.4 Predição dos sítios de N-Glicosilação	72

4.5 Reconstruções filogenéticas	78
DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS.....	102
ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido	102
ANEXO B - Representação esquemática dos testes realizados para a padronização da RT-multiplex PCR e da PCR para amplificação parcial do gene da HN.....	104
ANEXO C - Testes de alteração de volume de amostras	105
ANEXO D - Descrição das reações de Semi-nested PCR, realizadas com controles positivos e com as amostras que não amplificaram.....	106
ANEXO E - Pannel das amostras positivas para HPIV	107
ANEXO F: sequências do Genbank utilizadas na análise filogenética	111
ANEXO G: Sequências contidas na análise filogenética de HPIV-1	115
ANEXO H: Sequências contidas na análise filogenética de HPIV-2	117
ANEXO I: Sequências contidas na análise filogenética de HPIV-3	117

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, grande parte da população é acometida por infecções no trato respiratório, sendo os principais agentes infecciosos o Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV); Adenovírus; Influenza A e B; Parainfluenza 1, 2 e 3; Coronavírus; Rhinovírus, e o Metapneumovírus humano (KHAN, 2006).

Em 1956, Chanock et al., em seu estudo sobre o crupe (laringotraqueobronquite) infeccioso isolaram, a partir de amostras respiratórias, um agente capaz de formar um efeito citopático espongiiforme em culturas celulares, com tamanho estimado entre 150 e 200 nm, que foi designado como vírus AC (vírus associado à crupe) (Figura 1). A incidência de anticorpos contra este agente em crianças sem infecções respiratórias e em adultos jovens, também sugeriu, nesta época, que a infecção pelo vírus ocorria nos primeiros anos de vida.

Nesse mesmo estudo, os vírus AC foram relacionados ao grupo dos *Myxovirus*, por apresentarem propriedades pertinentes a este grupo como: hemaglutinação de hemácias de aves, receptores de eritrócitos sensíveis a RDE (Enzima Destruidora de Receptores, obtida de filtrado de *Vibrio cholerae*), crescimento na cavidade amniótica de ovos embrionados, tamanho em torno de 150 nm, sensibilidade ao éter e estabilidade à -70 °C. Entretanto, não foi encontrada relação antigênica com os vírus Influenza, Newcastle ou Sendai (CHANOCK et al., 1956, 1958) .

Baseado na natureza respiratória da infecção e nas propriedades físicas e morfológicas dos vírus, em 1959, o termo Parainfluenza foi criado para definir os quatro vírus, Parainfluenza 1, 2 e 3 (HPIV-1, HPIV2, HPIV3) e Sendai (SeV), (ANDREWES et al., 1959). Logo após sua descoberta, esses vírus passaram a ser descritos como importantes agentes causadores de laringotraqueobronquite (Parainfluenza 1, 2 e 3), pneumonia e bronquiolite (Parainfluenza 3) (CHANOCK; PARROT, 1965; CHANOCK et al., 1959; KIM et al., 1961), atingindo crianças, pacientes imunocomprometidos ou debilitados e idosos (DENNY; CLYDE, 1986; GLEZEN et al., 2000; MCINTOSH, 1991; WHIMBEY, 1997).

Figura 1 - Efeito citopático dos Myxovírus em amostras de crianças com CROUP.

Célula normal de epitélio de rim de Macaco, corada por hematoxilina e eosina 120x. 2. Efeito citopático em células epiteliais de rim de macaco, causado pela amostra Greer do vírus AC, corado por hematoxilina e eosina. 3. Célula normal de epitélio de rim de Macaco, sem coloração 120x. 4. Efeito citopático em células epiteliais de rim de macaco, causado pela amostra Greer do vírus AC, sem coloração.
Fonte: Chanock et al. (1956).

1.1 Taxonomia e morfologia

Os parainfluenzavirus pertencem à ordem *Mononegavirales* (vírus de fita simples de RNA não segmentada), família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*. Os vírus HPIV-1 (*Human parainfluenza virus 1*) e HPIV-3 (*Human parainfluenza virus 3*) pertencem ao gênero *Respirovirus* e os vírus HPIV-2 (*Human parainfluenza virus 2*), HPIV-4 (*Human parainfluenza virus 4*) ao gênero *Rubulavirus* (KING et al., 2011), sendo o HPIV-4 dividido em dois grupos antigênicos, denominados A e B, baseado na reatividade com anticorpos monoclonais (KOMADA et al., 1990). A segregação desses vírus em dois gêneros foi baseada em diversas evidências: (a) a relação antigênica e a identidade entre as sequências de aminoácidos são maiores dentro de um mesmo gênero, do que entre os diferentes gêneros; (b) presença de diferentes proteínas, os *Respirovirus* possuem a proteína C, que não é encontrada nos *Rubulavirus*; (c) as sequências conservadas presentes no final de cada gene e do genoma apresentam maior similaridade entre os vírus do mesmo gênero do que entre os diferentes gêneros; (d) as regiões intergênicas são conservadas nos *Respirovirus*, mas não nos *Rubulavirus*; (e) *Rubulavirus* possuem maior diversidade na organização genômica e na sequência de aminoácidos e nucleotídeos do que os *Respirovirus*, possuindo um gene adicional que codifica a proteína SH, presente no PIV-5 ou SV5 (parainfluenza 5 ou *simian virus 5*) (KARRON; COLLINS, 2007).

As partículas virais são pleomórficas e envelopadas, com diâmetro que varia de 150 a 200 nm. Sua superfície possui glicoproteínas de origem viral, a proteína F (de fusão) e a HN hemaglutinina-neuraminidase, que formam espículas, envolvidas nos processos de adsorção e fusão e que são importantes imunógenos (KARRON; COLLINS, 2007) (Figura 2A).

O genoma é composto por uma fita de RNA de polaridade negativa, com aproximadamente 15.000 nucleotídeos, que é envolvido por um nucleocapsídeo helicoidal, formando o complexo denominado ribonucleoproteína, RNP, que por sua vez está envolvido pela proteína da matriz (M) e por um envelope lipoprotéico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira infectada pelo vírus (KARRON; COLLINS, 2007).

1.2 Estrutura e organização genômica

Os parainfluenzavírus contém RNA de fita simples e polaridade negativa com cerca de 15.000 nucleotídeos (15.462 para HPIV-3, 15.646 nt para HPIV-2 e 15.600 nt para o HPIV-1) que transcrevem de 8 a 10 proteínas, dependendo do vírus (Figura 2) (STOREY; DIMOCK; KANG, 1984; WECHSLER et al., 1985). A transcrição ocorre no sentido 3'-5'. Antecedendo a região 3' há uma região extragênica, composta de 55 a 70 nucleotídeos, seguida por 6 ou 7 genes, dependendo do gênero do vírus. O promotor está presente nesta região se estendendo para a região 3' do primeiro gene, N. Cada um dos genes é separado por regiões intergênicas formadas por seqüências conservadas de três nucleotídeos nos *Respirovirus* e por regiões não conservadas de tamanho variável (de 1 a 42 nucleotídeos) nos *Rubulavirus* (KARRON; COLLINS, 2007).

Figura 2 - Vírus parainfluenza.

Diagrama esquemático dos vírus parainfluenza. B) Diagrama esquemático contendo a estrutura básica do genoma dos HPIV.

Fonte: SBI Swiss Institute of Bioinformatics (2012).

O último gene está seguido por uma região extragênica, conhecida como *trailer*, composta de 21 a 114 nt. A região 3' de cada gene dos HPIV possui uma sequência de 10 nucleotídeos (UCCUNNUUUC) chamada *gene start signal*, enquanto que a região 5' possui 12 nucleotídeos (UUCAUUCUUUUU) formando a região *gene end signal*. Ambas as regiões são relativamente conservadas.

Seis genes estão presentes em todos os parainfluenzavirus – 3' N-P-M-F-HN-L 5' (Figura 2B). Cada gene codifica apenas uma proteína, com exceção do gene P que codifica 2 ou mais proteínas dependendo do vírus. As proteínas P e V são codificadas por formas alternativas do

RNA_m transcrito a partir do gene P. Essas formas alternativas são obtidas pelo mecanismo de edição de RNA_m, no qual, por exemplo, um ou mais resíduos de G (guanina) são inseridos alterando o quadro de leitura aberto (KARRON; COLLINS, 2007).

Nos *Respirovirus* (p. exemplo - HPIV-3) uma cópia exata do RNA_m codifica a proteína P, e a forma editada pela inserção de dois resíduos de G, possibilitando a utilização de um segundo quadro de leitura (ORF), resultam na proteína D, enquanto que a proteína C é traduzida por uma segunda ORF dentro do gene P. Por outro lado, um deslizamento da polimerase em cis leva à adição de um resíduo de G durante a síntese do RNA_m, alterando o frame e acarretando a expressão de um ORF interno como químera fusionada à porção N-terminal da proteína P. Esta edição do RNA acarreta à tradução de uma proteína adicional, V, pelo HIV-3. Portanto, o genoma do HPIV-3, o mais estudado entre os parainfluenzavirus, é constituído por 8 genes que codificam 8 proteínas na seguinte ordem: (3'N-P-D-C-M-F-HN-L-5') (OHSAWA et al., 1998) (Quadro 1). O HPIV-1 possui 10 genes que codificam 10 proteínas (3' N-C'-P-C-Y1-Y2-M-F-HN-L 5') (NEWMAN et al., 2002) (Quadro 1). Nos *Rubulavirus* uma cópia exata do RNA_m codifica a proteína V e a forma editada (inserção de 2 G) codifica a proteína P. Portanto, o genoma do HPIV-2 é formado por 6 genes (3'N-P/V-M-F-HN-L-5') que codificam 7 proteínas (Quadro 1), no qual cada gene codifica uma proteína e o gene P codifica as proteínas P e V (KARRON; COLLINS, 2007, 2007; KAWANO et al., 1990, 1991).

Todos os parainfluenzavirus apresentam 6 proteínas comuns: HN, F, M, N, P e L. As proteínas N (nucleoproteína), L (*large*), e P (fosfoproteína), juntamente com o RNA, formam o nucleocapsídeo viral (Figura 2). A proteína N liga-se ao RNA_v, permitindo que as proteínas L (RNA polimerase) e P transcrevam e repliquem o genoma dos HPIV (KARRON; COLLINS, 2007). Uma ou mais proteínas adicionais, como C, V, D, W, I, SH não são essenciais para replicação *in vitro* e são conhecidas como proteínas acessórias.

Quadro 1 - Principais Proteínas do HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3

	Product Name	Start	End	Strand	Length	Accession
HPIV 1	Nucleoprotein	120	1694	+	524	NP_604433.1
	C' protein	1809	2468	+	219	NP_604434.1
	phosphoprotein	1844	3550	+	568	NP_604435.1
	C Protein	1854	2468	+	204	NP_604436.1
	Y1 protein	1923	2468	+	181	NP_604437.1
	putative Y2 protein	1941	2468	+	175	NP_604438.1
	Matrix Protein	3669	4715	+	348	NP_604439.1
	Fusion Protein	5088	6755	+	555	NP_604440.1
	Hemagglutinin-Neuraminidase	6903	8630	+	575	NP_604441.1
	Large protein	8772	15443	+	2223	NP_604442.1
HPIV 2	nucleocapsid protein	157	1785	+	542	NP_598401.1
	P protein	1993	3178	+	395	NP_599019.1
	V protein	1993	2670	+	225	NP_598402.1
	Matrix Protein	3479	4612	+	377	NP_598403.1
	Fusion Protein	4789	6444	+	551	NP_598405.1
	Hemagglutinin-Neuraminidase	6817	8532	+	571	NP_598405.1
	Large protein	8793	15581	+	2262	NP_598406.1
HPIV 3	nucleocapsid protein	111	1658	+	515	NP_067148.1
	phosphoprotein	1784	3595	+	603	NP_067149.1
	D Protein	1784	2903	+	373	NP_599250.1
	C Protein	1794	2393	+	199	NP_599251.1
	Matrix Protein	3753	4814	+	353	NP_067150.1
	Fusion Protein	5072	6691	+	539	NP_067151.1
	Hemagglutinin-Neuraminidase	6806	8530	+	574	NP_067153.2
	Large protein	8646	15347	+	2233	NP_67153.2

Start e end – indicam o início e fim da janela de leitura (ORF) de cada gene, *strand* – indica a polaridade, *length* – indica o tamanho da proteína, *accession* - indica o número de acesso ao Gene Bank.

Fonte: Viral Bioinformatic Resource Center (2010).

1.2.1 Proteína de matriz (M)

A proteína M (matriz) tem a função de mediar a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral nascente. Agrega-se, através de interações não covalentes, às extensões intracitoplasmáticas das glicoproteínas virais (F e HN) presentes na superfície interna da membrana citoplasmática e pode estar envolvida na inserção e agregação dessas proteínas à locais

específicos da membrana celular (CORONEL et al., 2001; HARRISON; SAKAGUCHI; SHIMITT, 2010; LANGEDIJK; DAUS; VAN OIRSSCHOT, 1997; PATTERSON; GROSS; OXFORD, 1988). Esta é a proteína mais conservada entre os membros da família *Paramyxoviridae* (SPRIGGS; JOHNSON; COLLINS, 1987).

1.2.2 Nucleoproteína (N)

A proteína N possui entre 509 a 597 resíduos de aminoácidos e peso molecular entre 66-70 kDa, sendo relativamente bem conservada (KARRON; COLLINS, 2007). Esta proteína liga-se ao RNA genômico e, juntamente, com a proteína P forma o complexo denominado ribonucleoproteína (RNP) helicoidal, que protege o genoma viral da ação de RNases. Após ser formado, o complexo RNP é incorporado dentro de novas partículas virais (HARRISON; SAKAGUCHI; SCHIMITT, 2010).

1.2.3 Proteína P

A proteína P é um tetrâmero associado ao nucleocapsídeo que possui de 568 a 603 aa e peso molecular variando de 49-53 kDa no gênero *Respirovirus* e de 392 a 399 aa e peso molecular de 83-90 kDa no gênero *Rubulavirus* (KARRON; COLLINS, 2007). É essencial para os mecanismos de transcrição e replicação, entretanto sua precisa função nesse processo ainda permanece desconhecida (FUENTES et al., 2010).

1.2.4 Proteína L

A proteína L (Large) é o principal componente da polimerase viral, sendo responsável pela síntese do RNA, *capping* e metilação do RNAm (KARRON; COLLINS, 2007). A proteína L está sempre complexada à proteína P, tanto quando está livre no citoplasma como quando está ligada à proteína N (NISHIO et al., 2011).

1.2.5 Proteína F

A glicoproteína F, também presente na superfície do envelope, está envolvida na fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, necessária para a penetração do nucleocapsídeo dentro da célula (KARRON; COLLINS, 2007). É uma proteína tipo I ancorada à membrana próxima à porção C-terminal e com domínio hidrofóbico clivável na porção N-terminal. Os primeiros 18 aminoácidos do HPIV-3 e 21 aa do HPIV-2 são hidrofóbicos e formam a sequência sinal responsável pela translocação da proteína pelo retículo endoplasmático rugoso, no qual ocorrem modificações após a tradução, como adição de cadeias laterais de carboidratos por ligação glicosídica tipo “N” (CHANOCK; McINTOSH, 1985).

Essa proteína é originalmente sintetizada como um precursor inativo (F₀), que necessita ser clivado por uma endopeptidase (Furin e Kex2) para dar origem à proteína ativa, composta de duas subunidades F1 e F2, ligadas por pontes dissulfídicas (figura 3) (HOMMA; OHUCHI, 1973; ORTMANN, 1994; PATERSON; SHAUGHNESSY; LAMB, 1989). Esta clivagem torna a proteína F ativa e promove tanto o início da infecção viral, pela a ligação ao receptor de ácido – siálico da célula, como a propagação do vírus de célula à célula pela formação de sincícios. A clivagem, portanto, é um pré-requisito para infectividade, o tropismo e a patogenicidade do vírus.

A porção F1 possui regiões com funções conhecidas que estão envolvidas em mudanças conformacionais durante o processo de fusão: a porção –N terminal, que contém um peptídeo de fusão hidrofóbico – que se insere na membrana alvo durante o processo de fusão, a porção -C terminal, o domínio transmembrana e duas regiões de repetição: HRA (*Heptad repeted A*) e HRB (*heptad repeted B*), que formam seis estruturas em hélice que são críticas para o processo de fusão (GARDNER; DUTCH, 2007) (Figura 3). Após a ativação pela proteína HN, a região HRB da proteína F se dissocia, a HRA sofre uma mudança conformacional e o peptídeo de fusão é inserido na membrana alvo. A fusão das membranas é catalizada pela formação de uma estrutura em forma de grampo (*coiled-coil hairpin*), formada pelas regiões HRA e HRB que se justapõem com o peptídeo de fusão inserido na membrana e com o domínio transmembrana (LUQUE et al., 2010). Por outro lado, aproximadamente 100 aa da subunidade F2 têm suas funções ainda desconhecidas (GARDNER; DUTCH, 2007).

Figura 3 - Representação esquemática da proteína F dos Paramyxovirus.

Após a ativação, o precursor F0 é clivado em duas subunidades F1 e F2 no sítio de clivagem 1 (CS1) ligado por uma ponte dissulfídica (S-S), localizado antes do domínio do peptídeo de fusão (FP). Para os *Pneumovirus*, um segundo sítio de clivagem (CS2) libera a proteína p27. HRA- *Heptad repeat A domain*; HRB- *Heptad repeat B domain*; TM –domínio transmembrana; N- porção N-terminal; C – porção C terminal; SP – peptídeo sinal.

Fonte: Le Bayon et al. (2012).

A região conservada da proteína F denominada “*Fusion gly*” caracteriza-se por possuir três blocos conservados (CB): um no peptídeo de fusão/ região HRA (*Heptad Repeated A*), envolvida na promoção da fusão da membrana celular, o segundo na subunidade F2, designada como bloco conservado na porção F2 (CBF2) e o terceiro correspondente a um longo trecho de aminoácidos localizados entre as regiões HRA e HRB da subunidade F1, designada como CBF1 (Bloco conservado na porção F1) (GARDNER; DUTCH, 2007). Luque et al. (2010) demonstraram que mutações na região *Heptad Repeated A* modulam a virulência do vírus Sendai (*Paramyxovirus*), influenciando a disseminação do vírus, bem como a gravidade da infecção.

1.2.6 Proteína HN

A proteína HN é uma glicoproteína transmembrana tipo II, que está ancorada à membrana próxima à sua porção amino-terminal por um domínio, não clivável, tipo sinal âncora. Possui tamanho aproximado de 570 aminoácidos (574 aa para HPIV-3, 571 aa para o HPIV-2 e 575 aa para o HPIV-1). Bastante imunogênica, está presente na superfície do vírus como um tetrâmero composto por dois dímeros ligados por pontes dissulfídicas. Sua porção amino-terminal, em forma de haste, é citoplasmática, enquanto a porção C-terminal, em forma de cabeça globular, é extracelular. Sendo esta última região a que retém todas as atividades biológicas e os principais sítios antigênicos (MOSCONA, 2005; POROTTO et al., 2012). Possui três importantes funções:

i) adsorção do vírus à célula hospedeira, via receptores de ácido siálico, ii) clivagem enzimática dos receptores na membrana da célula hospedeira, prevenindo assim que as partículas virais geradas no processo de replicação fiquem agregadas na célula hospedeira, impedindo sua liberação (LANGEDIJK; DAUS; VAN OIRSCHOT, 1997), iii) ativação da proteína F, mediando a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (POROTTO et al., 2007).

A estrutura terciária da proteína HN demonstra a forma de β -hélice com seis pás (*six bladed β propeller fold*) típica das neuraminidasas (Figura 4). A figura 5 representa o alinhamento de aminoácidos de vários vírus da família *Paramyxoviridae*, na qual observa-se a localização dos elementos da estrutura secundária, bem como a conectividade das seis pontes dissulfídicas. Cinco delas, representadas na figura pelas letras A, C, D, E e F são conservadas entre as HNs presentes no alinhamento (CRENNELL et al., 2000).

Figura 4 - Representação da proteína HN do HPIV-3 na forma hexagonal complexada com ácido β -siálico.

Cada polipeptídeo é mostrado na representação em fita seguindo a ordem das cores do arco-íris (porção N-terminal em vermelho até a porção C terminal em violeta). As porções N e C –terminal aparecem rotuladas; o ácido β -siálico é representado com bolas e hastes

Fonte: Lawrence et al. (2004).

Figura 5 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína HN de sete *Paramyxovirus* [Vírus Sendai; HPIV-1-Washington/1957; HPIV-3-Aus/124854/74; Vírus Simian-5-W3; HPIV-2; Vírus do Sarampo-Miyahara vaccine e Vírus Newcastle-Kansas (NDV)].

As ligações dissulfídicas estão indicadas por letras sequenciais do alfabeto (A,B,C,D,E e F) acima da seqüência do vírus Sendai. Os resíduos conservados nestas regiões entre os diferentes vírus estão grafados em vermelho. A localização das α -hélices e β sheet (folha β), estruturas secundárias da proteína, são mostradas abaixo da sequencia do NDV.

Fonte: Crennel et al. (2000).

A proteína HN é sintetizada como precursor HN₀ e sua ativação ocorre pela clivagem da porção carboxiterminal, resultando na perda de glicopeptídeo de 9 KDa, e em uma mudança conformacional que vai desestabilizar a proteína F, ativando-a (CONNOLLY et al., 2009). Dois sítios contribuem para a atividade da proteína: o sítio I, responsável pelas funções de ligação com o receptor e atividade de neuraminidase, e sítio II, que processa a atividade de fusão, ativando a proteína F (MOSCONA, 2005; POROTTO et al., 2006, 2007). O sítio I pode ser inibido pelo Zanamivir, enquanto o sítio II é insensível a esse medicamento (POROTTO et al., 2006, 2012). O harmonioso balanço entre as funções da proteína HN (ligação e clivagem do receptor) é indispensável à liberação das partículas virais da célula hospedeira (POROTTO et al., 2005). Porotto et al. (2012) avaliaram que o efeito de mutações nos sítios I (Thr193Ala) e II (His552Gln) proporcionam um aumento na avidade das ligações com os receptores celulares e na interação

entre as proteína HN e F (apenas o sítio His552Gln), provocando uma ativação excessiva da proteína F pela HN e, conseqüentemente, diminuindo a infectividade do vírus no hospedeiro natural. Outras mutações (Pro111Ser; Asp216Asn) na proteína HN, que podem levar a diminuição ou ao aumento da eficiência na ligação com o receptor celular, que ocasionam falha na ativação da proteína F, também foram identificadas (POROTTO et al., 2005). Estes eventos comprovam a importância da harmonia entre as diferentes funções da proteína HN e na interação entre as duas proteínas.

Lawrence et al. (2004) estudando a estrutura da proteína HN do HPIV-3, descreveram seus sítios ativos como sendo similares ao da proteína neuraminidase dos vírus influenza com três cadeias laterais de arginina (R192, R424, R512), projetadas em um dos lados da cavidade enzimática, e uma cadeia lateral conservada de tirosina (Y530) ligada a uma cadeia lateral de ácido glutâmico (E409) localizada no fundo desta cavidade. A cadeia lateral R424 é ligada por pontes de hidrogênio a E409. O outro lado da cavidade é parcialmente hidrofóbico (Y319). (Figura 6)

Figura 6 - Sítio ativo da proteína HN complexado com molécula de ácido siálico em amarelo.

W1 e W2 - sítios de moléculas de água. Linha tracejada – potenciais pontes de hidrogênio.
Fonte: Moscona (2005).

1.2.7 Proteínas assessórias- não estruturais (C, D, V, I)

A proteína C é uma proteína assessória, encontrada apenas nos *Respirorivus*, é abundante, porém não conservada (KARRON; COLLINS, 2007). Atua na regulação da síntese do RNA viral, inibição da produção de interferon pela célula hospedeira e na inibição da apoptose celular (HARRISON; SAKAGUCHI; SCHIMITT, 2010; KARRON; COLLINS, 2007).

O genoma do HPIV-1 codifica 4 proteínas não estruturais C' (219 aa), C (204 aa), Y1 (181 aa) e proteína Y2 (175 aa) conhecidas coletivamente como proteínas C, que auxiliam na replicação viral, estando envolvidas na liberação das partículas virais (NEWMAN et al., 2002). O HPIV-3 codifica apenas um tipo de proteína C (KARRON; COLLINS, 2007).

Os membros do gênero *Rubulavirus*, HPIV-2 e 4, sintetizam a proteína V, ao invés da proteína C, que é empacotada dentro da partícula viral e está ligada à proteína NP, participando da regulação da replicação viral (MATSUOKA et al., 1991; SCHAAPP-NUTT et al., 2011; WATANABE et al., 1996). Embora seja estruturalmente distinta da proteína C dos *Respirovirus*, ambas possuem funções em comum, tais como: bloqueio da produção de interferon, inibição da apoptose e retardo do ciclo celular (KARRON; COLLINS, 2007).

As proteínas I (*Rubulavirus*) e D (HPIV-3), sintetizadas por edição do RNAm do gene P, contém um domínio N-terminal que é idêntico ao da proteína P. A parte da proteína P que é presente nas proteínas V, I e D contém o domínio responsável para formação do complexo com a proteína N (KARRON; COLLINS, 2007).

1.3 Replicação

O ciclo de replicação dos parainfluenzas inicia-se quando a partícula viral liga-se a moléculas receptoras contendo ácido siálico que estão presentes na superfície de uma célula susceptível, este evento recebe o nome de adsorção viral e, no caso dos parainfluenza virus, é mediado pela proteína hemaglutinina (HN). Após a adsorção desta proteína viral ao receptor de ácido siálico presente na célula hospedeira, o nucleocapsídeo adentra no citoplasma através da fusão do envelope viral com a membrana celular, evento mediado pelas proteínas HN e F. No citoplasma os genes são transcritos no sentido 3'→5' pela enzima RNA polimerase RNA dependente. A transcrição é realizada por um mecanismo sequencial de início/fim, guiada pelos sinais de início e final de gene (*gene start signal* e *gene end signal*) (HENRICKSON, 2003). Os genes próximos à região 3' do genoma são transcritos com maior abundância, do que os genes próximos à região 5' (HARRISON; SAKAGUCHI; SCHIMITT, 2010).

Em adição à transcrição e à tradução de proteínas, outra etapa importante é a replicação do genoma viral, que produz um intermediário positivo (+ssRNA), que servirá como molde para gerar cópias do genoma viral (-ssRNA). A produção do intermediário positivo requer que a maquinaria de produção de mRNAs entre num modo de “anti-terminação”, ignorando todos os sinais de início e fim de cada gene (HARRISON; SAKAGUCHI; SCHIMITT, 2010).

A maturação do vírus ocorre, em primeira instância, com a combinação das proteínas N e P ao RNA genômico e subsequente adição de outras proteínas auxiliares ao nucleocapsídeo. As

glicoproteínas virais, HN e F, ocupam o lugar das proteínas celulares na membrana citoplasmática. A seguir, ocorre a agregação da proteína da matriz e o nucleocapsídeo alcança a superfície ocorrendo então o brotamento, com a liberação do vírus, sendo este o momento no qual adquire o envelope lipoprotéico (KARRON; COLLINS, 2007) (Figura 7).

Figura 7 - Ilustração do ciclo de replicação dos parainfluenzavirus.

A transcrição das proteínas e a replicação do genoma viral ocorrem no citoplasma. Após suas sínteses, as proteínas estruturais e as RNPs brotam juntas na membrana plasmática das células infectadas.
Fonte: Moscona et al. (2005).

1.4 Caracterização antigênica e genética

A análise de soros de animais na fase de convalescência demonstrou que estes apresentam anticorpos direcionados contra a maioria das proteínas estruturais dos HPIVs, entretanto, somente os anticorpos direcionados contra as proteínas HN e F demonstram capacidade de neutralizar a

infecção pelo vírus e induzir um alto nível de proteção. Fato este que transformou estas proteínas nos principais alvos para as pesquisas de desenvolvimento de vacinas anti- HPIVs (KARRON; COLLINS, 2007). Entretanto, apenas anticorpos anti-proteína F impedem a propagação do vírus célula a célula, impedindo a fusão entre elas (MERZ; SCHEID; CHOPPIN, 1980).

Na proteína HN do HPIV-3, são observados seis sítios antigênicos, sendo que cinco deles não se sobrepõe (A, B, D, E e F) e apenas o sítio C se sobrepõe aos sítios A e B (KARRON; COLLINS, 2007). Os sítios A, B e C estão envolvidos na neutralização dos vírus, com 11 epítomos específicos identificados, e na inibição da hemaglutinação (KARRON; COLLINS, 2007).

A proteína F do HPIV-3 apresenta 8 sítios antigênicos: 6 deles não sobrepostos, denominados de A a F, e um formando uma ponte entre os sítios A e B, denominado sítio AB (KARRON; COLLINS, 2007). O sequenciamento destes sítios possibilitou a verificação que a diversidade entre diferentes amostras estava relacionada à substituições específicas de alguns resíduos de aa localizados na subunidade F1 (posição 369, 397 ou 398) e na subunidade F2 (resíduo 37) (COELINGH; TIERNEY, 1989). Pelo menos 20 epítomos foram descritos nesta proteína, sendo 14 deles organizados dentro dos sítios antigênicos A, B, C e AB (KARRON; COLLINS, 2007).

Análise com um painel de anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína HN do HPIV-2 (amostra protótipo GREER) permitiu a identificação de 5 sítios antigênicos denominados de I a V, localizados em regiões da proteína relacionadas a atividade de hemaglutinação (sítios I, IV e V), hemaglutinação e neuraminidase (sítio II) e neuraminidase (sítio III) (RAY et al. 1992). Neste mesmo estudo foi verificada variabilidade antigênica entre amostras isoladas no Texas entre 1986 e 1987, que geraram tanto perda da atividade de neutralização com alguns anticorpos monoclonais como perda da atividade de neuraminidase. Entretanto, são poucos os dados disponíveis que permitem uma correlação da variabilidade antigênica com a variabilidade genética destes vírus (HENRICKSON, 2003).

Henrickson (1991), estudou a reatividade de amostras de HPIV-1, isoladas entre 1966 a 1983, com um painel de anticorpos monoclonais sintetizados a partir das proteínas HN, F e NP da amostra protótipo Washington 1957, sendo verificada uma diversidade antigênica, com diferenças persistentes, quando comparadas à cepa protótipo, que permitiram a divisão em dois grupos, denominados A e B. Em 1992, Komada et al. (1992), em estudo envolvendo amostras de

HPIV-1 isoladas no decorrer de 25 anos (de 1959 a 1989) e um painel de anticorpos monoclonais dirigidos contra 4 proteínas virais (HN, P, F e M) observaram diversidade antigênica entre as amostras, principalmente com relação à proteína HN, no qual as amostras isoladas após 1977 eram antigenicamente distintas de amostras isoladas anteriormente a este ano. Entretanto alguns dos epítomos reconhecidos pelos monoclonais anti-HN: MAbs II, IV, V e VI foram conservados em todas as amostras estudadas. Nesse mesmo estudo, não foram notadas diversidades antigênicas marcantes na proteína F dessas amostras.

As diferenças antigênicas verificadas entre ambos os grupos foram confirmadas pelo sequenciamento do gene, no qual verificou-se que as amostras do grupo A apresentaram uma menor diferença intragrupo que as amostras do grupo B (HETHERINGTON et al., 1994)

Análises filogenéticas posteriores do gene HN demonstraram a existência de 3 genótipos, denominados de A, C e D, que podem co-circular, sem o predomínio de um, durante um mesmo período, com múltiplas linhagens dentro destes grupos que podem aparecer e desaparecer no decorrer de décadas, apresentando variações mínimas (HENRICKSON; SAVATSKI, 1996; HETHERINGTON et al., 1994; MIZUTA et al., 2011). A taxa de evolução molecular do gene HN dos HPIV-1 é considerada relativamente lenta e gira em torno de $7,68 \times 10^{-4}$ substituições por sítio por ano (MIZUTA et al., 2011)

As variações antigênicas observada nos epítomos neutralizantes das proteínas HN e F foram inicialmente classificadas como resultantes de mutações randômicas que não estavam relacionadas à pressão seletiva (COELINGH et al., 1987). Em análises moleculares dos parainfluenzavirus 1, 2, 3 e 4, Coelingh et al. (1989) documentaram o acúmulo progressivo de alterações nas sequências genéticas desses vírus, resultando em linhagens distintas, entretanto, as alterações antigênicas observadas não foram cumulativas e/ou progressivas e também não se correlacionaram com as linhagens genéticas. Entretanto, análises moleculares dos 4 sorotipos de HPIV vem demonstrando que a variabilidade genética e antigênica é maior do que foi inicialmente reportado, uma vez que todos os sorotipos podem ser classificados em subgrupos que apresentam características genéticas e antigênicas únicas. O padrão evolucionário destes vírus foi descrito como semelhante ao vírus de Influenza B (HENRICKSON, 2003). (HENRICKSON, 2003).

1.5 Patogênese

A replicação do vírus ocorre nas células do epitélio respiratório, sendo o tropismo por esse tecido, direcionado pela proteína HN que se liga aos receptores de ácido siálico presentes na superfície das células. Estudos com HPIV-3, utilizando sistemas de cultura de células demonstram que tanto a entrada quanto a liberação do vírus ocorrem preferencialmente pela região apical das células ciliadas (BOSE; MALUR; BANERJEE, 2001; ZHANG et al., 2005). Testes *in vitro* revelaram que assim que ocorre a infecção de uma célula pelo HPIV, observa-se o arredondamento celular, o aumento do citoplasma e núcleo e posteriormente ocorre a formação de vacúolos citoplasmáticos; inclusões basófilas ou eosinófilas e formação de células gigantes multinucleadas conhecidas como sincícios (HENRICKSON, 2003).

A replicação dos HPIVs nas células epiteliais do trato respiratório pode ocasionar rinites, faringites, laringites, traqueobronquiolites, bronquiolites e pneumonias (KARRON; COLLINS, 2007). O início da infecção envolve as membranas nasais e da garganta, podendo ocorrer também a obstrução dos sinus paranasais e tubo de Eustáquio levando a sinusite e otite média. Em infecções mais extensas ocasionadas, principalmente, por HPIV-1 e HPIV-2 a laringe e a traquéia superior podem ser envolvidas causando a laringotraqueobronquiolite, ou ainda a infecção pode se estender para a traquéia inferior e os brônquios com acúmulo de muco resultando em atelectasia e pneumonia. Quando o HPIV-3 produz doença severa, ocorre a infecção das pequenas passagens de ar, ocasionando bronquiolites, bronquites e broncopneumonias (KARRON; COLLINS, 2007).

1.6 Clínica e diagnóstico laboratorial

A transmissão do vírus é direta e ocorre pessoa a pessoa pelo contato direto das mãos com a mucosa, principalmente ocular e nasal, e por gotículas de aerossóis disseminadas durante tosse e espirros, que podem ser inaladas ou contaminar superfícies (ECHEVARRÍA et al., 2000; JALAL et al., 2007). HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3 podem sobreviver cerca de 10 horas em superfícies não porosas e 4 horas em superfícies porosas (BRADY; EVANS; CUARTAS, 1990).

A infecção se inicia nas membranas mucosas do nariz e garganta, podendo haver obstrução dos sinus paranasais e tubos de Eustáquio. O período de incubação varia de 2 a 8 dias e

após 1 a 3 dias o vírus se dissemina pelo trato respiratório inferior. Em infecções mais severas, comumente provocadas pelo HPIV-1, pode haver envolvimento da laringe e traquéia superior, resultando na laringotraqueobronquite aguda (Crupe). A criança apresenta febre, tosse, obstrução laríngea e estridor inspiratório. Normalmente a faixa etária que mais desenvolve esses sintomas são as crianças entre 1 e 2 anos de idade. Embora o HPIV-1 seja o mais prevalente nessa síndrome, cerca de 10% dos casos são causados pelos HPIV-2 e HPIV-3 (HENRICKSON, 2003; IWANE et al., 2004).

Todos os HPIVs podem causar bronquiolite, entretanto HPIV-1 e HPIV-3 são os mais frequentemente relatados (HENRICKSON, 1999). Os sintomas incluem principalmente febre, tosse, rinorréia, chiado expiratório e taquipnéia (HSIEH et al., 2010). Normalmente ocorre no primeiro ano de vida. O HPIV-3 é o segundo mais importante agente causador de bronquiolite, sendo superado apenas pelo HRSV (vírus respiratório sincicial humano) (HENRICKSON, 1999). A pneumonia por HPIV é mais comumente causada pelos HPIV-1 e HPIV-3, sendo que cerca de 10% das pneumonias de etiologia viral são causadas por esses vírus.

Pacientes com sintomas no trato respiratório inferior, que não se encaixam nas síndromes acima descritas, recebem o diagnóstico de traqueobronquite. Os sintomas mais comuns são: tosse, ruído nas vias respiratórias na auscultação e febre, sendo o HPIV-3 mais frequentemente diagnosticado do que os HPIV-2 e HPIV-1, principalmente na idade escolar e adolescência (HENRICKSON, 2003; IWANE et al., 2004).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela detecção dos HPIVs em *swabs* nasofaríngeanos ou de garganta, lavados e aspirados nasais (FRAYHA et al., 1989; HEIKKINEN et al., 2002), sendo a detecção do vírus aumentada com a utilização em conjunto de amostras de *swab* nasal e aspirado nasofaríngeo (HEIKKINEN et al., 2002). A pesquisa do agente pode ser realizada através do isolamento em culturas de células, pela inoculação da amostra em células LLC-MK2, Vero, HeLa e HEp-2, pela pesquisa direta de antígenos virais nas espécimes clínicas por imunofluorescência, utilizando monoclonais específicos, e pela detecção do ácido nucléico viral, pela RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa) (HENRICKSON, 2003). Em laboratórios de rotina, a pesquisa do vírus por imunofluorescência é a técnica mais empregada, devido à boa sensibilidade, alta especificidade e reduzido gasto de tempo.

A detecção de anticorpos contra os HPIVs pode ser realizada por diversas metodologias, como ELISA, radioimunoensaio, inibição de hemaglutinação, fixação do complemento, *Western*

Blotting e ensaios de neutralização, entretanto, o diagnóstico de infecção aguda somente é possível através da observação do aumento de quatro títulos entre amostras de soro da fase aguda e crônica, ou pela detecção de anticorpos da classe IgM (HENRICKSON, 2003).

1.7 Prevenção e tratamento

O tratamento das infecções ocasionadas pelos parainfluenzavirus é apenas paliativo, visando à amenização dos sintomas. Em casos mais severos, principalmente incluindo pacientes transplantados, o uso de corticóides é indicado, diminuindo-se assim, a frequência de hospitalização e intubação de pacientes (NICHOLS et al., 2001).

Não há um tratamento antiviral específico de uso rotineiro para esses vírus nem vacinas aprovadas para utilização. Embora a ribavirina apresente atividade *in vitro* contra os HPIVs, sua eficácia *in vivo* não foi boa (NICHOLS et al., 2001). O zanamivir, inibidor de neuraminidase, interfere apenas no estágio inicial da infecção na ligação da HN ao receptor celular, mas não atua nas funções tardias da HN, permitindo a eficaz liberação de partículas virais das células infectadas, não sendo desta forma, indicado para o tratamento das infecções por HPIV (KARRON; COLLINS, 2007).

Uma grande promessa para o futuro são os inibidores de neuraminidase BCX2798 e BCX2855, que atuam no centro catalítico responsável pelo bloqueio tanto na ligação da HN ao receptor celular de ácido siálico, quanto na ativação da proteína F e na atividade de remoção do ácido siálico da superfície das partículas virais recém-liberadas da célula hospedeira (ALYMOVA et al., 2004, 2009). Esses inibidores foram desenhados com base na HN do vírus de Newcastle (*Newcastle disease virus*- NDV) complexada com o componente 2-deoxi-2,3-dideidro-N-ácidoacetilneuraminico (Neu5Ac2en). No BCX2798 e no BCX2855, o grupo hidroxil da posição O-4 do Neu5Ac2en foi substituído por um grupo azida e por um grupo diclorometanosulfonilamino, respectivamente. Desta forma os resíduos de aminoácidos que formam o sítio catalítico da HN dos HPIVs foram conservados e o inibidor poderá, portanto, ser utilizado para todos os HPIVs (WATANABE et al., 2009). Resultados preliminares de Watanabe et al. (2009), demonstraram a eficácia destes inibidores em modelo experimental com ratos, trazendo grandes perspectivas para o uso terapêutico e profilático das infecções por HPIV-3 em humanos.

Entretanto, a profilaxia ainda parece ser a melhor alternativa para o combate às infecções por parainfluenzavírus, sendo a população pediátrica a mais beneficiada. Inicialmente, foram realizadas tentativas utilizando vacinas preparadas a partir de ovos embrionados ou cultura de células. Estas vacinas mostraram-se imunogênicas em crianças, porém, a administração parenteral mostrou-se incapaz de induzir resistência à infecção pelos HPIVs. Outra tentativa foi a utilização de vacinas com fragmentos das proteínas HN e F obtidos a partir de partículas de HPIV-3 purificadas, de baculovírus expressando as proteínas HN e F, ou ainda proteínas obtidas por engenharia genética. Embora a administração parenteral e intranasal em roedores tenham produzido bons níveis de anticorpos protetores, estes candidatos vacinais não foram validados em primatas não humanos ou em protocolos clínicos (KARRON; COLLINS, 2007; LE BAYON, et al. 2012; SATO; WRIGHT, 2008).

Atualmente, o principal foco das pesquisas se concentra no desenvolvimento de vacinas com HPIVs atenuados. As tentativas iniciais foram realizadas com os vírus parainfluenza bovino (BPIV-3) e Sendai (SeV), utilizados como vacinas vivas atenuadas. Embora ambos os vírus apresentem uma boa relação antigênica com HPIV-3 e HPIVI-1, respectivamente, não proporcionaram nível adequado de proteção quando administrados em humanos (KARRON; COLLINS, 2007).

Outra estratégia vacinal bastante explorada é a utilização de vírus sensíveis à temperatura (“*cold passage vírus*”), sendo o primeiro candidato promissor a cepa mutante *cp45*, que apresentou bons resultados em estudos de fase 1 e 2 (KARRON; COLLINS, 2007; SATO; WRIGHT, 2008).

Atualmente, o desenvolvimento e caracterização das cepas atenuadas têm sido facilitados pelo desenvolvimento da genética reversa, que pode ser utilizada para criar um painel de mutações que podem ser incorporadas a um candidato vacinal, para ajustar a atenuação de um fenótipo, ou ainda inserir uma informação obtida durante a avaliação clínica. Outra aplicação importante da genética reversa é a transferência de substituições de aminoácidos atenuados de um vírus para outro em nível de DNA por mutagênese direta (KARRON; COLLINS, 2007)

Utilizando a genética reversa, Zhan et al. (2008), construíram uma vacina inserindo as proteínas HN e F do HPIV-3 no SeV. Esta vacina foi capaz de conferir proteção contra HPIV-1 e HPIV-3. Em 2009, JONES et al., utilizando estratégia semelhante, porem com a introdução das

proteínas HN do HPIVI-2, HN do HPIVI-3 e F do RSV no vetor SeV, conseguiram demonstrar a proteção contra os vírus HPIV-1, HPIVI-2, HPIV-3 e RSV em camundongos.

1.8 Epidemiologia

Os parainfluenzavirus (1, 2, 3 e 4) possuem distribuição mundial, causando infecções respiratórias agudas no trato respiratório de humanos. São considerados importantes patógenos respiratórios durante a primeira e a segunda infância, causando desde infecções inaparentes até infecções graves como pneumonias e bronquiolites. Em adultos a prevalência dos HPIVs é relativamente baixa (YU et al., 2012). Entre 2,6 a 3,4%, das crianças com infecções respiratórias e idade até sete anos, que procuraram serviços de saúde em Massachusetts e Boston, Estados Unidos, um dos HPIVs foi detectado (BOURGEOIS et al., 2006). Knott, Long e Hall (1994) em seu estudo de epidemiologia das infecções virais observou uma prevalência de 13,2 % dos HPIV entre as crianças menores de 5 anos estudadas.

No Brasil, estudo realizado em crianças hospitalizadas na cidade de São Paulo em 2003, verificou-se que dentre os vírus de parainfluenza, os mais detectados foram o tipo 3, correspondendo a 8,3% do total de amostras, seguido pelo o tipo 1, detectado em 0,6% (THOMAZELLI et al., 2003).

Os surtos do HPIV-1 ocorrem no outono sendo que a maioria das infecções ocorre entre sete e 36 meses de idade, com um pico de incidência entre o segundo e o terceiro ano de vida. As principais síndromes são traqueobronquite e pneumonia (CARBALLAL et al., 2001; ECHEVARRIA et al., 2000; HSIEH et al., 2010; MARX et al., 1997). A ocorrência de surtos a cada dois anos em ambos os hemisférios é a marca do HPIV-1. Nos Estados Unidos relata-se que no mínimo 50% dos casos de crupe são causados por esse vírus e, durante cada surto, estima-se que seja a causa de 18.000 a 35.000 internações de crianças abaixo de 5 anos, sendo portanto, o principal agente causador de crupe em crianças (HENRICKSON, 2003).

Os surtos de HPIV-2 podem ser anuais ou também bianuais, ocorrendo junto com o HPIV-1 ou em anos alternados. A maioria das infecções causada por esse vírus ocorre no outono (HSIEH et al., 2010) e início de inverno (ECHEVARRÍA et al., 2000). As infecções respiratórias ocasionadas por esse vírus são detectadas menos frequentemente do que as ocasionadas por HPIV-1 e HPIV-3, talvez devido à maior dificuldade de isolamento. Embora todas as síndromes

tenham sido descritas (MURPHY et al., 1980), a laringotraqueobronquite (crupe) é a infecção mais frequentemente relacionada com este vírus, sendo que cerca de 60% das infecções ocorrem nas crianças menores de cinco anos, com o pico de infecção ocorrendo entre o primeiro e o segundo ano de vida (HENRICKSON, 2003).

As infecções com HPIV-1 e 2 geralmente ocorrem mais tarde durante a infância, porém a maioria das crianças com até 5 anos já foram infectadas. O HPIV-3 é o mais frequente entre os parainfluenzas nas infecções em crianças menores de seis meses de idade, sendo a maioria dessas infecções reportadas até os 12 meses de idade, como bronquiolites e pneumonias, Endêmico em todo o mundo, as epidemias ocorrem na primavera e verão (BROOR et al., 2007; HSIEH et al., 2010; KNOTT et al., 1994).

O sequenciamento de regiões variáveis das proteínas HN e F possibilitou a identificação de transmissão nosocomial de HPIV-3 em unidades de transplantes e a incidência desse vírus, também fora da época de surtos, nessas unidades. Esses surtos nosocomias parecem resultar não só da introdução de cepas da comunidade, via profissionais da saúde e visitantes, mas também são decorrentes do longo período de excreção do vírus (cerca de quatro meses) observado nesses pacientes (JALAL et al., 2007; NICHOLS et al., 2004).

Poucos relatos epidemiológicos existem a respeito do HPIV-4. As infecções parecem ocorrer em todas as faixas etárias. Estudos de soroprevalência demonstram que crianças possuem títulos significantes de anticorpos anti-HPIV-4 ao nascerem, entretanto, estes títulos caem significativamente entre os sete e 12 meses de idade, voltando a subir entre os 3 a 5 anos de vida (HENRICKSON, 2003). Aproximadamente 95% dos adultos possuem anticorpos anti-HPIV-4A e, 75% contra o HPIV-4B (HENRICKSON, 2003). Embora as infecções pelo HPIV-4 tenham sempre sido relatadas como infecções leves, foram descritas infecções severas em crianças, de uma instituição para deficientes mentais, estudadas durante novembro de 2004 (LAU et al., 2005). Estudos da diversidade genética demonstraram uma grande variabilidade entre as cepas circulantes em um mesmo surto. Echevarría et al. (2000), estudando um fragmento do gene HN (427 nt do HPIV-1 e do HPIV-3, 457 nt do HPIV-2), observaram divergências nas seqüências dos HPIVs que variaram de 1 a 23 nucleotídeos no HPIV-1, de 1 a 28 no HPIV-2 e de 1 a 27 no HPIV-3. Zambon et al. (1998), estudaram um fragmento de 237 nt da proteína F do HPIV-3 e observaram a circulação de três linhagens diferentes denominadas A, B, e C em um mesmo surto, demonstrando um padrão de circulação temporal e geográfico. Portanto, fragmentos de regiões

conservadas do genoma apresentam diversidade suficiente para distinguir muitos isolados e poder ser utilizado em estudos de epidemiologia molecular dos HPIVs.

Embora os HPIVs tenham sido isolados pela primeira vez há mais de quarenta anos, a verificação da heterogeneidade entre as cepas de cada gênero é relativamente recente (ECHEVARRÍA et al., 2000; JALAL et al., 2007; MIZUTA et al. 2012; ZAMBON et al., 1998). Portanto, muitas questões ainda estão em aberto quanto ao padrão epidemiológico dos vírus, quanto à relevância das diferenças entre as cepas virais no desenvolvimento de uma possível vacina e quanto à evolução dos vírus.

2 OBJETIVOS

O presente estudo visou caracterizar geneticamente as cepas brasileiras de HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3, circulantes durante o período de 1995 a 2005 pelo sequenciamento parcial do gene da proteína HN.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, utilizamos amostras de coleção do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, obtidas de crianças atendidas no Hospital Universitário da USP, e gentilmente cedidas pelo Dr. Edison Luiz Durigon, durante os anos de 1995 a 2005. Como estratégia de trabalho foi realizada, inicialmente, uma *multiplex* RT-PCR para detectar e tipar os HPIVs (tipo 1, 2 e 3). De posse dos resultados obtidos nesta primeira etapa, foram realizadas as amplificações do fragmento de HN dos parainfluenzavirus, bem como seu posterior sequenciamento e análise filogenética.

3.1 Casuística - amostras de coleção

Foram analisadas 2152 amostras colhidas de crianças atendidas na enfermaria ou Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) com sintomatologia respiratória, durante o período de 1995 a 2005.

Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon (Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo - ICB II - USP). A colheita foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB/ USP (parecer 808/CEP) e foi realizada após consentimento dos responsáveis legais, que assinaram um Termo de Consentimento Pós-Informado (ANEXO A).

3.2 Colheita das amostras

Os espécimes clínicos consistiam de *swab* nasal e aspirado de nasofaringe. As amostras colhidas conforme Myao et al. (1999) foram encaminhadas, em gelo, para o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (ICB II – USP). As amostras foram processadas segundo Vieira et al. (2001), sendo a alíquota destinada à estudos moleculares tratada com 75% de TRIzol[®] LS (*InvitrogenTM*, Carlsbad, Califórnia, EUA) (250 µL da amostra e 750 µL de TRIzol[®] LS). Esta alíquota foi utilizada neste estudo para extração do RNA total.

3.3 Extração do RNA total

Para extração do RNA foi utilizada a alíquota estocada com TRIzol[®] LS (250 µL da amostra e 750 µL de TRIzol[®] LS), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, em cada amostra foram acrescidos 100 µL de clorofórmio (*Merck[®]*, Frankfurt, Hesse, Alemanha) gelado. As amostras foram homogeneizadas em agitador (*Vortex AP 56*, Phoenix Luferco, Araraquara, São Paulo, Brasil) durante 15 segundos e deixadas em gelo por 5 minutos. Após esse período, foram centrifugadas a 15.000 x g a 4 °C por 15 minutos (*Centrifuge 5804R*, *Eppendorf[®]*, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante, ou fase aquosa contendo RNA, foi transferido para um novo tubo acrescido de isopropanol (*Merck[®]*) gelado em volume igual ao sobrenadante. Os novos tubos foram homogeneizados e incubados em gelo por 15 minutos. Após esse período, foram centrifugados a 15.000 x g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 800 µL de etanol (*Merck[®]*) a 75% gelado. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 8.000 x g a 4 °C por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 50 µL de água destilada livre de DNase e RNase (*InvitrogenTM*) e utilizado, em seguida, na obtenção do cDNA. Todo o procedimento foi realizado em gelo.

Em todas as extrações, um controle negativo, composto de 250 µL de água destilada livre de DNase e RNase (*InvitrogenTM*) e 750 µL de TRIzol[®] LS foi processado em paralelo. Como controles positivos foram utilizadas amostras cultivadas de HPVI-1, HPIV-2 e, HPIV-3,

provenientes de painel de proficiência, gentilmente cedidos pelo Instituto Fleury (CEP Instituto 2008/021).

3.4 Obtenção do cDNA

O cDNA foi obtido utilizando o kit *High Capacity Archive* (Applied Biosystems, Inc, Foster City, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante para obtenção de um volume final de 100 µL de reação. Resumindo, em um microtubo de 0,2 mL foram adicionados 10 µL de tampão de RT (10x) (20 mM Tris-HCL [pH 8]; 50 mM KCl; 0,5 mM EDTA; 8 mM DTT; 50% (v/v) glicerol), 2,5 mM de cada dNTPs, 200 U da enzima MultiScribe™ Transcriptase Reversa (transcriptase reversa de *Moloney murine leukemia virus* recombinante (rMoMuLV), 40 U de RNaseOUT™ (Invitrogen), 10 µL de *Random primer* (10x), água destilada livre de DNase e RNase (*Invitrogen*™) para completar o volume de 50 µL de amostra. A extensão foi realizada em termobloco *ThermoStatplus* (Eppendorf®) a 25 °C por 10 minutos, seguido a 37 °C por 2 horas. Os cDNAs dos controles, negativos e positivos, foram sintetizados concomitantemente em cada reação realizada.

3.5 Otimização da *multiplex*-RT-PCR para detecção dos parainfluenzavirus 1, 2 e 3 (triagem das amostras)

A triagem das amostras foi realizada pela *Multiplex*- RT-PCR com utilização de *primers* complementares ao gene HN dos HPIV-1, HPIV-2 e, HPIV-3, descritos por Echevarria et al. (1998). A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade e a sequência 5'–3' estão representados no Quadro 2.

Para a otimização da reação foram realizadas uma série de testes fixando-se o Tampão de Reação (75 mM Tris-HCl [pH – 9,0], 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄) (Biotools) e variando-se o volume de amostra, as concentrações de: magnésio, *primers*, dNTPs e enzima e o número de ciclos, para uma reação com volume final de 25 µL. Foram realizadas um total de 45 testes, esquematizados no ANEXO D, com as amostras padrão de cada HPIV cultivadas em cultura de células.

Finalizados os testes, a reação final da *multiplex*- RT-PCR ficou estabelecida da seguinte maneira: 2,5 µL do cDNA em Tampão de Reação 75 mM Tris-HCl [pH – 9,0], 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂ (Biotools), 0,2 mM de cada dNTP; 1,0 U de Biotools *DNA Polymerase* (Biotools); 10 pMol de cada *primer* específico para cada HPIV, sendo os *primers* de polaridade (+) marcados com FAM, e água livre de DNase e RNase (*Invitrogen*TM) para completar um volume final de 25 µL. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo. A amplificação foi realizada no *GeneAmpPCR System 9700* – a 95 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para denaturação do DNA molde, 1 minuto a 56 °C para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das novas cadeias. Findos os ciclos segue-se um aquecimento a 72 °C por 7 minutos para extensão final.

Quadro 2 - Relação dos *primers* utilizados na triagem, localização, polaridade, sequência de nucleotídeos e tamanho do amplicon esperado.

Vírus	Primer	Polaridade	Seqüência de nucleotídeos / 5' - 3'	Região	Produto Amplificado
HPIV_1	PIS1_1	<i>Sense</i>	CCGGTAATTTCTCATACCTATG	780-801	316
	PIS1_2	<i>Antisense</i>	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	1076-1096	
HPIV_2	PIS2_1	<i>Sense</i>	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	845-866	203
	PIS2_2	<i>Antisense</i>	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA	1027-1048	
HPIV_3	PIS3_1	<i>Sense</i>	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT	884-905	102
	PIS3_1	<i>Antisense</i>	TAAATCTTGTTGTTGAGATTG	966-986	

Fonte: Echevarría et al. (1998).

3.6 Otimização da amplificação parcial do gene HN

A amplificação do gene HN dos HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3, foi realizada utilizando os *primers* descritos por Echevarría et al. (1998) e utilizando amostras padrão cultivadas em cultura de células. A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade e a sequência de nucleotídeos 5'–3' e o tamanho do produto amplificado e estão representados na Quadro 3 e figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da região amplificada do gene HN dos HPIV-1, HPIV-2 e, HPIV-3.

Em branco está representado o gene da HN, 1877 nt (sentido 3' – 5'). Em azul está representada a porção do gene HN correspondente à região codificadora da Sialidase – nt 477 a 1689. Em rosa, está representada a região amplificada e posteriormente submetida ao sequenciamento de nucleotídeos (nt 750 a 1300). Fonte: Perini (2012).

Quadro 03 - Relação dos *primers* utilizados na amplificação do gene da HN, localização, polaridade, sequência de nucleotídeos e tamanho do amplicon

Vírus	Primer	Polaridade	Sequência de nucleotídeos / 5' - 3'	Região	Produto Amplificado
PCR					
HPIV_1	PIP1_1	<i>sense</i>	CCTTAAATTCAGATATGTAT	748–768	477
	PIP1_2	<i>Antisense</i>	GATAAATAATTATTGATACG	1206–1225	
HPIV_2	PIP2_1	<i>Sense</i>	AACAATCTGCTGCAGCATTT	803–822	507
	PIP2_2	<i>Antisense</i>	ATGTCAGACAATGGGCAAAT	1291–1310	
HPIV_3	PIP3_1	<i>Sense</i>	CTGTAAACTCAGACTTGGTA	762–781	477
	PIP3_2	<i>Antisense</i>	TTTAAGCCCTTGTCACAAC	1220–1239	

Fonte: Echevarria et al. (1998).

Foram realizados uma série de testes fixando-se o Tampão de Reação (75 mM Tris-HCl [pH – 9,0], 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄) (Biotools) e variando-se o volume de amostra, as concentrações de: magnésio, *primers*, dNTPs e enzima e o número de ciclos, para uma reação com volume final de 25 µL. Foram realizados um total de 45 testes, esquematizados no ANEXO B com cada um dos HPIVs padrão, cultivados em cultura de células.

Finalizados os testes não foi possível a visualização do produto por eletroforese em gel de agarose em nenhum dos testes realizados. Novos testes foram realizados com diferentes volumes de amostras (1 µL; 2,5 µL; 5 µL ; 7,5 µL; 8 µL; 9 µL e 10 µL) (ANEXO C). Ainda com dificuldades na visualização do produto amplificado, partimos para a realização de uma segunda PCR a partir dos produtos obtidos da primeira amplificação, sendo desta forma possível a visualização dos produtos amplificados.

Portanto, a reação para a amplificação parcial do gene da proteína HN, foi estabelecida com a realização de duas PCRs, sendo a primeira diluindo 10 µL do cDNA em Tampão de Reação 75 mM Tris-HCl [pH – 9,0], 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂ (Biotools), 0,2 mM de cada dNTP; 1,0 U de Biotools *DNA Polymerase (Taq)* (Biotools); 10 pMol de cada *primer* específico para cada HPIVe água livre de DNase, RNase (*InvitrogenTM*) para completar um volume final de 50 µL. A segunda PCR foi realizada, diluindo 5 µL do produto de amplificação da primeira PCR em Tampão de Reação 75 mM Tris-HCl [pH – 9,0], 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂ (Biotools), 0,2 mM de cada dNTP; 1,0 U de Biotools *DNA Polymerase (Taq)* (Biotools); 10 pMol de cada *primer* específico para cada HPIVe água livre de DNase, RNase (*InvitrogenTM*) para completar um volume final de 50 µL, sendo todo este procedimento realizado em banho de gelo. Ambas as amplificações foram realizadas no *GeneAmpPCRSystem 9700* – a 95 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para denaturação do DNA molde, 1 minuto a 52 °C para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das novas cadeias. Findos os ciclos segue-se um aquecimento a 72 °C por 7 minutos para extensão final.

3.7 Detecção dos produtos amplificados

A detecção dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose (*InvitrogenTM*) a 2,0% em tampão TBE 1,0 x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA [pH –

8,0]) e 0,5 mg/mL de brometo de etídeo. Uma mistura de 4 µL de amostra e 1 µL de *loading buffer* foi submetida a eletroforese em cuba horizontal (C.B.S. EC-320 Minicell Submarina) em tampão TBE 1,0 x durante 50 minutos a 100 V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta, sendo registrada em foto-documentador BioDoc-It™ (Imaging System).

3.8 Testes realizados nas amostras não amplificadas pelo protocolo utilizado

Com o intuito de aumentar a sensibilidade da PCR e realizar a amplificação de amostras não amplificadas pela reação previamente otimizada foram realizadas novas alterações, uma vez a padronização foi realizada apenas com amostras padrão de HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3, cultivadas em cultura de células.

Inicialmente as amostras não amplificadas foram submetidas a novas reações alterando-se a temperatura de hibridação para 50 °C com a finalidade de diminuir a estringência da reação. Paralelamente, também foram testadas enzimas de diferentes fabricantes (Platinum® Taq DNA polimerase - Invitrogen, Taq DNA polimerase – Promega), e por último foi realizada uma *semi-nested* PCR utilizando os *primers* PIP descritos no Quadro 3 e PIS, não marcados com FAM, descritos no Quadro 2, conforme esquema descrito na figura 9, (ANEXO D). Entretanto não obtivemos resultados satisfatórios com nenhuma alteração testada.

Figura 9 - Esquema da *semi-nested* PCR utilizada na amplificação das amostras que não foram amplificadas pelo protocolo original.

Fonte: Perini (2012).

3.9 Purificação e quantificação dos produtos amplificados

Os produtos amplificados dos genes HN foram purificados pela metodologia de precipitação com etanol e acetato, descrita brevemente a seguir: ao produto de PCR foi adicionado 10% de acetato de potássio 3 M e 2 vezes o volume de etanol (*Merck*[®], Frankfurt, Hesse, Alemanha) absoluto gelado. Após incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight* as amostras foram centrifugadas a $15.000 \times g$ / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o tubo seco a temperatura ambiente por 10 minutos. Ao sedimento formado, foram adicionados 250 μL de etanol a 70% gelado e a seguir foram centrifugados a $15.000 \times g$ e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5804 R) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram virados sob um papel toalha até secar. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 20 μL de água livre de DNase e RNase (InvitrogenTM).

Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, conforme descrito na seção 3.7, e quantificadas com o auxílio de marcador de peso molecular (DNA Mass Ladder - Biotools).

3.10 Reação de sequenciamento

Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction versão 3.1* (Applied Biosystem, Inc. EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para o sequenciamento parcial do gene da hemaglutinina-neuraminidase (HN) foram utilizados os mesmos *primers* utilizados na amplificação (Quadro 3), conforme Echevarría et al. (1998).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando, cerca de 20 ng do produto purificado diluído em 2 µL de tampão de reação *Save Money* (Applied Biosystems, Inc., EUA), 2 µL de “*Terminator ready reaction mix, Big Dye*” (Applied Biosystem, Inc. EUA), 4 pmoles de cada *primer* separadamente (*sense* e *anti-sense*) e água ultra PURE (InvitrogenTM) para o volume final de 10,0 µL. Todo o procedimento foi realizado em gelo.

A extensão enzimática foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Inc., EUA) a 94 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos compostos de 15 segundos a 96 °C para desnaturação, 20 segundos a 50 °C para hibridização dos *primers* e 4 minutos a 60 °C para extensão das cadeias.

3.11 Purificação dos produtos amplificados

Após a reação de sequenciamento, visando à remoção do excesso de dideoxinucleotídeos, as amostras foram novamente purificadas pela precipitação com isopropanol. Para esta purificação foram adicionados 150 µL de isopropanol absoluto a 15 µL de amostra sendo esta mistura incubada durante 15 minutos. Após a incubação o produto foi centrifugado a 15.000 x g /25 minutos/10 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado lavado com 250 µL de isopropanol a 75 % seguido de centrifugação a 15.000 x g/10 min/10 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados no mesmo termociclador a 80 °C por 2 minutos para secar. Em seguida os tubos foram armazenados a – 20 °C até serem submetidas à eletroforese em polímero POP6 utilizando-se sequenciador automático *ABI PRISM® 3100* (Applied Biosystems).

3.12 Processamento e alinhamento das sequências do gene HN

A edição das sequências e montagem dos contigs foram realizadas com auxílio do programa Seq Man 4.05 - Expert Analysis Software - DNASTAR, Inc., EUA. As sequências do gene da HN de HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3 obtidas foram alinhadas separadamente com outras sequências da mesma região obtidas de vírus de várias regiões do mundo, depositadas no GenBank, utilizando o programa Se-Al - *Sequence Alignment Editor* (RAMBAUT; CHARLESTON, 2001) ou *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Os alinhamentos correspondentes foram convertidos no formato Nexus para as análises subsequentes.

3.13 Análise filogenética

Inicialmente, realizou-se o teste de razão de verossimilhança para a escolha do modelo evolutivo a ser utilizado, com auxílio do programa *Modeltest* versão 3.06 (POSADA; CRANDALL, 1998). Uma vez escolhido o modelo, os dados foram analisados pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo de *Neighbor Joining* e o programa *PAUP*4.0* versão Beta - *Sinauer Associates, Inc* (SWOFFORD, 1998).

3.14 Predição dos sítios de N-glicosilação

Para esta análise foram utilizadas as sequências obtidas neste estudo convertidas em formato fasta. O programa empregado para a predição dos sítios de N-glicosilação foi o NeNtGlyc 1.0 Server (GUPTA et al., 2004).

4 RESULTADOS

Um total de 2152 amostras foram submetidas à triagem pela *multiplex* RT-PCR para a detecção dos vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, seguida de amplificação, por PCR, e sequenciamento parcial do gene HN destes vírus.

4.1 Detecção dos vírus parainfluenza 1, 2 e 3 entre os anos de 1995 a 2005, pela *multiplex* RT-PCR

A *multiplex* RT-PCR, utilizando os *primers* complementares ao gene codificador da proteína HN dos parainfluenza 1, 2 e 3, marcados com FAM (PIS1, PIS2 e PIS3 – quadro 2), geraram um produto de 316 pares de base (pb) para o HPIV-1; 203 pb para HPIV-2 e 102 pb para HPIV-3 (figura 10).

Figura 10 - Detecção e tipagem das amostras pela *multiplex* RT-PCR.

Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *multiplex* RT-PCR utilizando os *primers* PIS1, PIS2 e, PIS3. Canaleta 1: Peso Molecular 100 pb (Biotoools B & M LABS.S.A.); Canaletas 2 a 11: amostras clínicas (ano/nº da amostra): 2) 2000-53; 3) 2000-54; 4) 2000-55; 5) 2000-56; 6) 2000-57; 7) 2000-58; 8) 2000-59; 9) 2000-60; 10) 2000-61; 11) 2000-62; -63. Canaleta 12: Controle negativo; Canaleta 13: Controle positivo para HPIV-1, HPIV-2e HPIV-3.

Fonte: Perini (2012).

Das 2152 amostras submetidas à *multiplex* RT-PCR, 6% (n=135) foram positivas para um dos parainfluenzavirus (Tabela 1). Embora o número de amostras avaliadas por ano fosse variável, o índice de positividade variou de 1 % em 1996 até 18 % em 1999, sendo que nenhum dos vírus foi detectado em 1997.

Tabela 1- Número total de amostras analisadas provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário da USP, número total de amostras positivas para todos os HPIV e para cada um dos HPIVs (HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3)

Ano	Número de amostras avaliadas	HPIV positivo (%)	HPIV 1 (%)	HPIV 2 (%)	HPIV 3 (%)
1995	189	19 (10)	3 (16)	2 (11)	14 (74%)
1996	195	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
1997	62	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1998	72	9 (11)	1 (11)	0 (0)	8 (89)
1999	154	28 (18)	4 (14)	1 (4)	23 (82)
2000	199	10 (5)	0 (0)	1 (10)	9 (90)
2001	104	5 (5)	2 (40)	0 (0)	3 (60)
2002	161	10 (6)	1 (10)	0 (0)	9 (90)
2003	307	18 (6)	0 (0)	0 (0)	18 (100)
2004	406	24 (6)	5 (21)	2 (8)	17 (71)
2005	303	11 (4)	1 (9)	1 (9)	9 (82)
Total	2152	135 (6)	17 (13)	7 (5)	111 (82)

Fonte: Perini (2012)

Das 135 amostras positivas para parainfluenzavirus foi possível determinar a idade de 79 % (n=107), sendo a maior positividade foi verificada em crianças com idade ≤ 12 meses (102/107), com pico de incidência em crianças com idade ≤ 6 meses 52 % (56/107) (ANEXO G). O índice de positividade verificado para cada um dos HPIVs entre as crianças com idade inferior ou igual a 6 meses foi de 53,3 % (8/15) para o HPIV-1, 33,3 % (2/6) para o HPIV-2, e 53,5 % (46/86) para HPIV-3. Por outro lado, observamos que em todos os casos de infecção por HPIV em crianças com idade igual ou inferior a 1 mês (8/107 – 7,47 %) foi detectado o HPIV-3 (ANEXO E).

Os parainfluenzavirus foram detectados em todos os meses do ano, não sendo possível determinar um período definido dos surtos devido à variabilidade do número de amostras colhidas a cada ano e a falta de alguns registros sobre a data de coleta. Entretanto, observamos que os casos de infecções por HPIV foram mais detectados entre os meses de outono e inverno

(figura 11). A avaliação isolada da sazonalidade de cada tipo de vírus não foi possível devido ao número reduzido de amostras positivas para HPIV-1 e HPIV-2. A maior positividade para o HPIV-3 foi verificada entre os meses de abril a outubro (ANEXO E).

Figura 11 - Distribuição de HPIV mês a mês durante os anos de 1995 a 2005.

Fonte: Perini (2012)

4.2 Amplificação parcial do gene da hemaglutinina para o sequenciamento

A amplificação do fragmento do gene da hemaglutinina foi realizada conforme descrito na seção 3.6, e os produtos revelados conforme item 3.7. Das 135 amostras detectadas como HPIV positivas na triagem inicial, obtivemos êxito na amplificação de apenas 42, gerando produtos de 477 nt para HPIV-1 e HPIV-3 e de 507 nt para HPIV-2 (figura 12). Entre as amostras não amplificadas, 38 não possuíam volume suficiente, sendo por este motivo, descartadas do estudo (ANEXO E).

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da RT-PCR utilizando os *primers* PIP1, PIP2 e PIP3 para a amplificação do gene HN.

Canaleta 1: Peso Molecular 100 pb; Canaletas 2- 20 amostras clínicas (ano/nº. da amostra). 2)1999-05; 3) 1999-13; 4) 1999-29; 5) 1999-38; 6) 1999-62; 7) 1999-104; 8) 1999-141; 9) 1999-101; 10) 1999-143; 11) 1999-152; 12) 1999-165; 13) 2003-337; 14) 2000-4; 15) 2000-9; 16) 2000-59; 17) 2001-13; 18) 2003-198; 19) 2003-217; 20) 2003-310.

Fonte: Perini (2012).

4.3 Análise do sequenciamento parcial do gene da hemaglutinina

Entre as amostras sequenciadas, 38 foram de HPIV-3, sendo avaliado um fragmento com cerca de 423 nt, correspondendo às posições 717 a 1145 do gene HN da cepa Walsh 1957 (número de acesso genbank-JN089924.1). Um total de 31 alterações de nucleotídeos foram observadas em relação a esta cepa, sendo observada maior variabilidade (9,6 %) entre as amostras do ano de 1999 (Quadro 4).

Quadro 4 - Principais alterações de nucleotídeos do gene da HN das sequências de HPIV-3 obtidas (nucleotídeos de 717 a 1141) comparadas com a sequência de HN da cepa Walsh (1957).

nucleotídeo (posição)	Walsh 1957 JN089924.1	Amostras analisadas						
		1995	1999	2000	2002	2003	2004	2005
723	T	C	C-T	C-T	T	T	C	C-T
738	T	T	C-T	C	C	C-T	C	C-T
759	A	A	A-G	A-G	A	A	G	A
768	T	C	TC	C	C	C	C	C
810	G	A	A	A	A	A-G	A	A
816	C	C	C-T	C-A	A	A-T	A	A-C
847*	T	C	T	T	T	T	T	T
883*	C	C	T	T	T	T	T	T
891	T	C	C	C	C	C	C	C
897	C	A	C	C	C	C	C	C
915	G	G	G-A	G	G	G-A	G	G-A
918	C	T	T	T	T	T	T	T
924	T	T	T-C	T	T	T	T	T
930	T	T	T-C	T	T	T	T	T
948	G	G	G-T-A	G-A	G	G	G	G
951	A	A	A-G	A	A	A	A	A
952	T	T	C-T	T	T	T	T	T
975	G	T	C-G	G	G	G-C	G	G
1005	C	C	T-C	C	C	C	C	C
1009	G	G	G-A	G	G	G	G	G
1014	A	A	A-T	A	A	A	A	A
1026	T	C	C-T	T	T	T	T	T
1043*	C	C	C-T	C	C	C	C	C
1044*	A	A	G-A	A	A	A	A	A
1050	C	C	C-T	C	C	C	C	C
1068	C	T	T-C	T	T	T	T	T
1077	G	A	A	A	A	A	A	A
1095	G	G	G-A	G	G	G	G	G
1110	C	A	A	A	A	A	A	A
1122	C	T	A-T	T	T	T	T	T
1140	C	C	C-T	T	T	T	T	T-C

(*) posições com mutações não silenciosas.

Fonte: Perini (2012).

As sequências traduzidas de aminoácidos foram para alinhadas com a sequência da cepa Washington 1957 C243 (figura 13). A alteração na posição 295 da proteína (His → Tyr) foi verificada nas amostras brasileiras em praticamente todos os anos estudados, com exceção das amostras do ano de 1995. Outras mutações pontuais foram verificadas, dentre as quais se destacam as alterações nos resíduos 283 (Ser→Pro), presente em todas as

amostras de 1995 e 348 (Val $\rightarrow$ Ala) que ocorreu apenas em 3 amostras do ano de 1999 (101, 149, 154). (Quadro 5).

Quadro 5 - Relação das alterações de aminoácidos da proteína HN de HPIV-3 verificadas nas amostras brasileiras em comparação com a amostra padrão Washington 1957.

<i>NOME / POSIÇÃO</i>	<i>240 a 260</i>	<i>261 a 281</i>	<i>282 a 302</i>	<i>303 a 323</i>	<i>324 a 344</i>	<i>345 a 365</i>	<i>366 a 380</i>
Br_1995_62			Ser383→Pro				
Br_1995_64			Ser383→Pro				
Br_1995_164			Ser383→Pro				
Br_1999_154	Arg253→Gly					Ala348→Val Ile349→Val	Ser369→Arg Phe372→Val Asp374→Glu Arg375→Gly
Br_1999_101	Lys254→Gln					Ala348→Val	
Br_1999_149		Lys273→Leu				Ala348→Val	
Br_1999_151							Ser369→Arg Phe372→Asn Ser373→Pro Asp374→Ser Ser367→Pro
Br_2000_09							
Br_2000_04			Gly284→Phe				
Br_2003-338	Asn240→Ile Ile243→Phe	Thr264→Pro Thr 271→Pro Gln267→His Pro272→Gln					
Br_2003_217							Phe372→Val
Br_2003_289						Asn351→His Asn364→Lys	Phe372→Val Met377→Lys
Br_2003_343		Val274→Ile					

Quadro 5: Continuação

<i>NOME / POSIÇÃO</i>	<i>240 a 260</i>	<i>261 a 281</i>	<i>282 a 302</i>	<i>303 a 323</i>	<i>324 a 344</i>	<i>345 a 365</i>	<i>366 a 380</i>
Br_2003_344						Ile344→Met	
Br_2003_345		Cys269→Val					
Br_2004_349	Asn240→Ile					Asn364→Ile	Ser367→Pro
	Asn252→Lys						
Presente em todas as amostras, exceto as de 1995			Hys295→Tyr				

Fonte: Perini (2012).

Figura 13 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HN de 37 amostras de HPIV-3 obtidas no período de 1995 à 2005.

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
washington_1957	C243LIYAYTSNLITRGCDIGKSYQVLQIGIITVNSDLVPLNPRISHTFNINDNRKSCSLALLNTDVYQLCSTPKVDERSDYASSGIEDIVLDIVNHDGSIS									
Br_1995_62									P	
Br_1995_64									P	
Br_1995_164									P	
Br_1999_143										Y
Br_1999_144										Y
Br_1999_154					G					Y
Br_1999_153										Y
Br_1999_101					Q					Y
Br_1999_149							L			Y
Br_1999_151										Y
Br_2000_185										Y
Br_2000_186										Y
Br_2000_187										Y
Br_2000_188										Y
Br_2000_09										Y
Br_2000_198										Y
Br_2000_04								F		Y
Br_2002_154										Y
Br_2002_163										Y
Br_2002_173										Y
Br_2003_341										Y
Br_2003_345							V			Y
Br_2003_343							I			Y
Br_2003_355										Y
Br_2003_338				I	F	P		P		Y
Br_2003_339										Y
Br_2003_331										Y
Br_2003_344										Y
Br_2003_217							H	Q		Y
Br_2003_225										Y
Br_2003_340										Y
Br_2003_289										Y
Br_2003_342										Y
Br_2003_337										Y
Br_2004_349					K					Y
Br_2005_207										Y
Br_2005_336										Y

Continuação Figura 13.

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
washington_1957 C243	TTRFKNNISFDQPYAALYPSV	PGIYYKGIIFLGYGGLEHPINENAICNTTGC	PGKTQ	RDCNQASHSPWFSDRRMVNSIIIVVDKGLNSIPKLKVTIS						
Br_1995_62										
Br_1995_64										
Br_1995_164										
Br_1999_143										
Br_1999_144										
Br_1999_154										
Br_1999_153										
Br_1999_101										
Br_1999_149										
Br_1999_151										
Br_2000_185										
Br_2000_186										
Br_2000_187										
Br_2000_188										
Br_2000_09										
Br_2000_198										
Br_2000_04										
Br_2002_154										
Br_2002_163										
Br_2002_173										
Br_2003_341										
Br_2003_345										
Br_2003_343										
Br_2003_355										
Br_2003_338										
Br_2003_339										
Br_2003_331										
Br_2003_344										
Br_2003_217										
Br_2003_225										
Br_2003_340										
Br_2003_289										
Br_2003_342										
Br_2003_337										
Br_2004_349										
Br_2005_207										
Br_2005_336										

Foi incluída no alinhamento a cepa padrão Washington 1957 C243 (JN089924.1). Somente os aminoácidos distintos desta cepa estão destacados. Caixas em vermelho indicando as regiões conservadas entre os membros da Família *Paramyxoviridae*. (-) indica o fragmento não sequenciado. Sítios de N-glicosilação - indicados pelas caixas amarelas.

Fonte: Perini (2012).

Comparando a única sequência de HPIV-2 obtida com a amostra GREER-J-1, isolada em 1995 (número de acesso Genbank-AB367954.1), foi possível visualizar 31 alterações no fragmento de 485 nucleotídeos avaliado, correspondente às posições 617 a 1102 do gene da HN, das quais 23 foram mutações não silenciosas (Quadro 6, Figura 14)

Figura 14 - Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos da HN de 1 amostra de HPIV-2 obtidas no período de 1995 à 2005.

	1	11	21	31	41	51
' Greer-J1 '	MEDYSNLSLK	SIPKRTCRII	FRTATILGIC	TLIVLCSSIL	HEIIHLDVSS	GLMDSDDSQQ
Br_2000_59	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	61	71	81	91	101	111
' Greer-J1 '	GIIQPIIESL	KSLIALANQI	LYNVAIIIPL	KIDSIETVIY	SALKDMHTGS	MSNTNCTPGN
Br_2000_59	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	121	131	141	151	161	171
' Greer-J1 '	LLLHDAAYIN	GINKFLVLKS	YNGTPKYGPL	LNIPSFIPSA	TSPNGCTRIP	SFSLIKTHWC
Br_2000_59	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	181	191	201	211	221	231
' Greer-J1 '	YTHNVILGDC	LDFTTSNQYL	AMGIIQQSAA	AFPIFRTMKT	IYLSDGINRK	SCSVTAIPGG
Br_2000_59	-----	-----	-----	S	E	A.....
	241	251	261	271	281	291
' Greer-J1 '	CVLYCYVATR	SEKEDYATTD	LAE LR LAFYY	YNDTFIERVI	SLPNTTGQWA	TINPAVGSGI
Br_2000_59		VR.....				
	301	311	321	331	341	351
' Greer-J1 '	YHLGFILFPV	YGGLIKGTPS	YNKQSSRYFI	PKHPNITCAG	KSSEQAAAAR	SSYVIRYHSN
Br_2000_59		N..S.	..E.....	.T.....	NPR.R.....	G.ND...QA.

Continuação Figura 14

	361	371	381	391	401	411
' Greer-J1 '	RLIQSAVLIC	PLSDTHTARC	NLVMFNNSQV	MMGAEGRLYV	IDNNLYYYQR	SSSWWSASLF
Br_2000_59	..T...I---	-----	-----	-----	-----	-----
	421	431	441	451	461	471
' Greer-J1 '	YRINTDFSKG	IPPIIEAQWV	PSYQVPRPGV	MPCNATSFCP	ANCITGVYAD	VWPLNDPEPT
Br_2000_59	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	481	491	501	511	521	531
' Greer-J1 '	SQNALNPNYR	FAGAFLRNES	NRTNPTFYTA	SASALLNTTG	FNNTNHKAAY	TSSTCFKNTG
Br_2000_59	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	541	551	561	571		
' Greer-J1 '	TQKIYCLIII	EMGSSLLGEF	QIIPFLRELI	P*		
Br_2000_59	-----	-----	-----	-		

Foi incluída no alinhamento a cepa padrão Greer J1 (AB367954.1). Somente os aminoácidos distintos desta cepa estão destacados. Caixas em vermelho indicando as regiões conservadas entre os membros da Família *Paramyxoviridae*. (-) indica o fragmento não sequenciado. Sítios de N-glicosilação - indicados pelas caixas amarelas.

Fonte: Perini (2012).

Quadro 6 - Principais alterações de nucleotídeos do gene HN verificados na amostra Br_2000_59 de HPIV-2 em comparação com a cepa padrão Greer J-1 (acesso GeneBank AB367954.1).

nucleotídeo (posição)	Nucleotídeo Greer J-1	Nucleotídeo Amostra Br_2000_59	Aminoácido alterado
658*	A	T	Thr220→Ser
688*	A	G	Lys230→Glu
693	C	T	-
703*	A	G	Thr235→Ala
732	T	C	-
755*	A	T	Glu252→Val
758*	A	G	Lys253→Arg
780	T	C	-
790	C	T	-
795	A	G	-
939	T	A	-
948*	G	T	Lys316→Asn
955*	C	T	Pro319→Ser
967*	A	G	Lys323→Glu
995*	A	C	Lys332→Thr
995*	A	C	Lys332→Thr
1020	T	A	-
1023*	A	C	Lys341→Asn
1024*	T	C	Ser342→Pro
1027*	A	C	Ser343→Arg
1034*	A	G	Glu345→Arg
1051*	A	G	Ser351→Gly
1057*	T	A	Tyr353→Asn
1059*	T	C	Tyr353→Asn
1061*	T	A	Val354→Asp
1062*	A	C	Val354→Asp
1068	T	G	-
1074*	C	G	His358→Gln
1075*	T	G	Ser359→Ala
1088*	C	T	Lle363→Thr
1099*	G	A	Val367→Ile

Nucleotídeos de 617 a 1102 do gene da proteína HN e aminoácidos 207 a 367. (*) posições com mutações não silenciosas e aminoácidos da proteína alterados

Fonte: Perini (2012).

Quando as 3 sequências de nucleotídeos do gene HN obtidas das amostras de HPIV-1 foram comparadas com a amostra Washington 1964 (número acesso Genbank: AF457102.1) foi possível verificar a alteração de 22 estados de caracteres no fragmento de 481 nucleotídeos avaliado, correspondente às posições 750 a 1230. A amostra circulante em

1995 apresentou um total de 13 alterações de nucleotídeos, (2,7% de substituições em relação à amostra Washington 1964), e as amostras circulantes em 2001 e 2002 apresentaram um total de 19 (3,9%) e 17 substituições (3,5%), respectivamente (Quadro 7). A distância par a par (*pairwise distance*) entre as amostras brasileiras foi em média $0,012 \pm 0,002$ (média $\pm$ desvio padrão). Observamos, no fragmento estudado que, embora as 3 amostras circulassem anos distintos (1995, 2001 e 2002), todas apresentaram alterações de aminoácidos nas posições 335 Ile→Val; 349 Asp→Asn e 358Thr→Pro (Figura 15, Quadro 7). No entanto, a maioria das substituições foram silenciosas (9/13 para a amostra Br_136_1995, 15/19 para Br_13_2001 e 13/17 para Br_153_2002) (Quadro 7).

[illegible]

Continuação Figura 15

	541	551	561	571	
HIPV1_Whashington1964	KGYCFHIVEI	NQASLNTLQP	MLFKTSIPKI	CKITS*	
HPIV1_Br_1995_136	-----	-----	-----	-----	
HPIV1_Br_2001_013	-----	-----	-----	-----	
HPIV1_Br_2002_153	-----	-----	-----	-----	

Foi incluída no alinhamento a cepa padrão Washington 1964 (AF45102.1). Somente os aminoácidos distintos desta cepa estão destacados. O número acima das sequências representam a posição do aa na proteína. Caixas em vermelho indicando as regiões conservadas entre os membros da Família *Paramyxoviridae*. (-) indica o fragmento não seqüenciado. Sítios de N-glicosilação - indicados pelas caixas amarelas.

Fonte Perini (2012).

Quadro 7- Principais alterações de nucleotídeos nas amostras de HPIV-1 amplificadas pela RT-PCR. (nucleotídeos de 750 a 1230 do gene da proteína HN).

nucleotídeo (posição)	Walsh 1964 AF457102.1	Amostras analisadas			Aminoácido alterado		
		1995	2001	2002	1995	2001	2002
785	G	G	A	A	-	-	-
789*	A	A	A	G	-	-	Lle245→Val
854	G	A	G	G	-	-	-
860	T	T	C	C	-	-	-
872	C	C	T	T	-	-	-
899	C	T	T	T	-	-	-
923 [#]	T	C	C	C	-	-	-
929	A	A	A	G	-	-	-
950 [#]	G	A	A	A	-	-	-
965	T	T	C	C	-	-	-
1022	G	A	A	A	-	-	-
1043	AG	G	G	G	-	-	-
1059**	A	G	G	G	Lle335→Val [#]	Lle335→Val [#]	Lle335→Val [#]
1070 [#]	G	A	A	A	-	-	-
1101*	G	A	A	A	Asp349→Asn	Asp349→Asn	Asp349→Asn
1106	T	C	C	C	-	-	-
1118	A	A	C	A	-	-	-
1128**	AG	C	C	C	Thr358→Pro [#]	Thr358→Pro [#]	Thr358→Pro [#]
1131	A	A	T	A	-	-	-
1136*	T	T	A	T	-	Asn359→Tyr	-
1137*	A	T	T	A	Asn361→Tyr	-	-
1229	T	A	-	A	-	-	-

Nucleotídeos de 750 a 1230 do gene da proteína HN e aminoácidos 232 a 391. (*) posições com mutações não silenciosas, (#) alterações de aminoácidos características do genótipo C.

Fonte: Perini (2012).

4.4 Predição dos sítios de N-glicosilação

Um total de três sítios de N-glicosilação foram preditos na sequência de aminoácidos da proteína HN da amostra padrão Washington 1957 de HPIV-3, que correspondem à asparagina (N) presente nas posições 308, 425 e 523. A tradução do fragmento de nucleotídeos sequenciado do gene HN neste estudo compreendeu a região entre os resíduos 240 a 380, contendo, portanto, apenas um dos sítios preditos (308), que se manteve em todas as amostras estudadas (figura 16).

A sequência de aminoácidos da proteína HN da amostra padrão de HPIV-2 (GREER-J1) submetida à análise de predição de sítios de N-glicosilação revelou a presença de um total de 7 sítios preditivos, sendo 3 deles presentes dentro da região estudada (resíduo 207 a 367). Na amostra de HPIV-2 brasileira (Br_2000_59) encontramos 4 sítios preditivos de N-

glicosilação, sendo este sítio extra devido a substituição da Lisina pela Aspargina na posição 316 (figuras 17 e 18).

Na análise da amostra padrão de HPIV_1_Washington_1964 (número de acesso Genbank AF457102.1) demonstrou a presença de oito sítios de N-glicosilação, entretanto, apenas dois deles estavam presentes dentro da região estudada (resíduo 233 a 392). Entre as amostras de HPIV-1 sequenciadas, foi observado que os dois sítios de N-glicosilação preditos na amostra padrão HPIV_1_Washington_1964 (numero de acesso Genbank AF457102.1) foram mantidos nas amostras BR_2001_013 e Br_2002_153, entretanto na amostra Br_1995_136, a substituição de Aspargina por Tirosina na posição 361 da Hemaglutinina ocasionou a perda do sítio de N-glicosilação (figura 19).

Figura 16 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV-3, Washington_1957_C243(JN089924.1).

A)

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury	N-Glyc agreement result	
HPIV_3_washington_1957_C243_JN089924.1	308	NISF	0.6200	(8/9)	+
HPIV_3_washington_1957_C243_JN089924.1	351	NTTG	0.4651	(6/9)	-
HPIV_3_washington_1957_C243_JN089924.1	485	NPTG	0.5513	(7/9)	+
HPIV_3_washington_1957_C243_JN089924.1	523	NKTL	0.5090	(4/9)	+

WARNING: PRO-X1.

NetNGlyc 1.0: predicted N-glycosylation sites in HPIV-3-washington-1957-C243-JN089924.

B)

Name: HPIV_3_washington_1957_C243_JN089924.1 Length: 572

```

MEYWKHTNHGKDAGNELETSMATHGNKITNKITYILWTIILVLLSIVFIIVLINSIKSEKAHESLLQDVNNEFMEVTEKI      80
QMASDNINDLIQSGVNTRLTIQSHVQNYIPISLTQQMSDLRKFISEITIRNDNQEVPPQRI THDVGIKPLNPDDFWRCT      160
SGLPSLMKTPKIRLMPGPGLLAMPPTVDGCVRTPTSLVINDLIYAYTSNLI TRGCQDIGKSYQVLQIGIITVNSDLVPDLN      240
PRISHTFNINDNRKSCSLALLNTDVYQLCSTPKVDERSDYASSGIEDIVLDIVNHDGSISTTRFKNNNISFDQPYAALYP      320
SVGPGIYYKGKIIIFLGYGGLLEHPINENAICNTTGC PGKTQRDCNQASHSPWFSDRRMVNSIIVVDKGLNSIPKLKVVTTIS      400
MRQNYWGWSEGRLLLLGNKIYYTRSTSWHSLQLGIIDITDYS DIRIKWTWHNVLSRPGNNECPWGHSCPDGCITGVYTD      480
AYPLNPTGSIYSSVILDSQKSRVNPVITYSTATERVNELAIRNKTLSAGYTTTSCITHYNGGYCFHIVEINHKS LDTFQP      560
MLFKTEIPKSCS

```

A) Resultado gráfico da análise preditiva de N-glicosilação, no qual foram identificados como potenciais sítios os resíduos de Asparagina presentes nas posições 308, 485 e 523. B) Sequência de aminoácidos da proteína HN. Os motivos para N-glicosilação, Asn-X-Ser/Thr, estão em azul e os resíduos de Asparaginas (N) preditas como sítios de N-glicosilação estão em vermelho. Sequência selecionada em amarelo refere-se ao fragmento da hemaglutinina avaliado em nosso estudo.

Fonte: Perini (2012).

Figura 17 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV-2, Greer-J1 (acesso Genbank AB367954.1).

Name: HPIV_2_GREER-J1_AB367954.1_complete Length: 634

A)

(Threshold=0.5)

B)

```

MEDYSNLSLKSIKRTCRIFRTATILGICTLIVLCSSILHEIHLVDVSSGLMDSDDSQQGIIQPIIESLKSLIALANQI      80
LYNVAIIIPKIDSIETVIYSALKDMHTGMSMNTNCTPGNLLLHDAAYINGINKFLVLKSYNGTPKYGPLLNIPSFIPSA      160
TSPNGCTRIPSFSLIKTHWCYTHNVILGDCLDFTTSNQYLAMGIIQQSAAAFPIFRTMKTIYLSGGINRKSCSVTAIPGG      240
CVLYCYVATRSEKEDYATTDLAELRLAFYYYNDTFIERVISLPNTTGQWATINPAVSGGIYHLGFIILFPVYGGLIKGTPS      320
YNKQSSRYFIPKHPNITCAGKSSEQAAAAARSSYVIRYHSNRLIQSAVLICPLSDTHTARCNLVMFNNSQVMMGAEGRLYV      400
IDNNLYYYQRSSSWWSASLFYRINTDFSGKIPPIIEAQWVPSYQVPRPGVMPCNATSFPCPANCITGVYADVWPLNDPEPT      480
SQNALNPYRFAGAFLRNESNRTNPTFTYASASALLNTTGFNNTNHKAAYSSTCFKNTGTQKIYCLIIIEMGSSLLGEF      560
QIIPFLRELIP
  
```

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	6 NLSL	0.7317	(9/9)	++
Sequence	115 NCTP	0.1922	(9/9)	---
Sequence	142 NGTP	0.1944	(9/9)	---
Sequence	272 NDTF	0.6346	(9/9)	++
Sequence	284 NTTG	0.5620	(8/9)	+
Sequence	335 NITC	0.6944	(9/9)	++
Sequence	386 NNSQ	0.4556	(7/9)	-
Sequence	454 NATS	0.6104	(7/9)	+
Sequence	498 NESN	0.4400	(7/9)	-
Sequence	501 NRTN	0.5464	(6/9)	+
Sequence	504 NPTF	0.4682	(5/9)	-
Sequence	517 NTTG	0.5212	(5/9)	+
Sequence	522 NNTN	0.3814	(8/9)	-

A) Resultado gráfico da análise preditiva de N-glicosilação, no qual foram identificados como potenciais sítios os resíduos de Asparagina presentes nas posições 6, 272, 284, 335, 454, 501, 517. B) Sequência de aminoácidos da proteína HN. Os motivos para N-glicosilação, Asn-X-Ser/Thr, estão em azul e os resíduos de Asparinas (N) preditas como sítios de N-glicosilação estão em vermelho. Sequência selecionada pelo em amarelo refere-se ao fragmento da hemaglutinina avaliado em nosso estudo.

Fonte: Perini (2012).

Figura 18 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV_2_Br_2000_059

Name: Br_2000_59 Length: 163

A)
(Threshold=0.5)

B)

QSAAAFPIFRTMKSIYLS DGINRESCSVAAIPGGCVLYCYVATRSVREDYATTDLAELRLAFYYYNDTFIERVISLPTNT 80

GQWATINPAVGSGIYHLGFILFPVYGGLI NGTSSYNEQSSRYFIPTHPNITCAGNPRERAAAARGSN DIRYQANRLTQSA 160

I

SeqName	Position	Potential	Jury Agreement	N-Glyc result
Br_2000_59	65 NDTF	0.6558	(9/9) ++	
Br_2000_59	77 NTTG	0.5756	(8/9) +	
Br_2000_59	110 NGTS	0.6818	(9/9) ++	
Br_2000_59	129 NITC	0.5548	(7/9) +	

A) Resultado gráfico da análise preditiva de N-glicosilação, no qual foram identificados como potenciais sítios os resíduos de Asparagina presentes nas posições, 65, 77, 110, 129. B) Sequência de aminoácidos da proteína HN. Os motivos para N-glicosilação, Asn-X-Ser/Thr, estão em azul e os resíduos de Asparaginas (N) preditas como sítios de N-glicosilação estão em vermelho. Caixa em verde refere-se ao sítio extra preditivo de N-glicosilação surgido pela substituição de Lisina por Asparagina.

Fonte: Perini (2012).

Figura 19 - Análise preditiva dos sítios de N-glicosilação da amostra HPIV_1_ Washington 1964 (acesso Genebank AF457102.1) e das amostras brasileiras .

Name: HPIV_1_Washington_1964_AF457102.1 Length: 575

A)

(Threshold=0.5)

B)

```

MAEKGKTNSSYWSTTRNDNSTVNTHINTPAGRTHIWLLIATTMHTVLSFIIMILCIDLIKQDTCMKTNIMTVSSMNESA      80
KIIKETITELIRQEVISRTINIQQSSVQSGIPILLNKQSRDLTQLIEKSCNRQELAQICENTIAIHADGISPLDPHDFWR      160
CPVGEPLLSNNPNISLLPGPSLLSGSTTISGCVRLPSLSIGDAIYAYSSNLITQGCADIGKSYQVLQGLYISLNSDMYPD      240
LNPVISHTYDINDNRKSCSVIAAGTRGYQLCSLPTVNETTDYSSEGIEDLVFDILDDLKGKTKSHRYKNEDITFDHPFSAM      320
YPSVSGSGIKIENTLIFLGYGGLTTPLQGDTKCVINRCTNVNQSVCNDALKITWLKKRQVVNVLIRINNYLSDRPKIVVET      400
IPITQNYLGAEGRLKLGKKIYIYTRSSGWSNLQIGSLDINNPMTIKWAPHEVLSRPGNQDCNWNRCPRECISGVYTD      480
AYPLSPDAVNVATTTLYANTSRVNPTIMYSNTSEIINMLRLKNVQLEAATTTSCITHFGKGYCFHIVEINQASLNTLQP      560
MLFKTSIPKICKITS
  
```

SeqName	Position	Potential	Jury	N-Glyc agreement result
Sequence	8 NSSY	0.6541	(9/9)	++
Sequence	19 NSTV	0.7650	(9/9)	+++
Sequence	77 NESA	0.4460	(6/9)	-
Sequence	173 NISL	0.5497	(7/9)	+
Sequence	277 NETT	0.5360	(3/9)	+
Sequence	361 NQSV	0.5413	(4/9)	+
Sequence	499 NTSR	0.5427	(7/9)	+
Sequence	504 NPTI	0.6824	(9/9)	++ WARNING: PRO-X1.
Sequence	511 NTSE	0.4967	(5/9)	-

C)

Name: Br_2001_013 Length: 129

```

PIPDMPDLNPNVISHTYDINDNRKSCSVIAAGTRGYQLCSLPTVNETTDYSSEGIEDLVFDILDDLKGKTKSHRYKNEDIT      80
FDHPFSAMYPYPSVSGSGIKIENTLVFLGYGGLTTPLQGNTKCVINRCPYV
  
```

Name: Br_1995_136 Length: 160

```

PIXDMPDLNPNVISHTYDINDNRKSCSVIAAGTRGYQLCSLPTVNETTDYSSEGIEDLVFDILDDLKGKTKSHRYKNEDIT      80
FDHPFSAMYPYPSVSGSGIKIENTLVFLGYGGLTTPLQGNTKCVINRCPNVYQSVCNDALKITWLKKRQVVNVLIRINNYLS      160
  
```

Name: Br_2002_153 Length: 160

```

PIXDMPDLNPNVISHTYDINDNRKSCSVIAAGTRGYQLCSLPTVNETTDYSSEGIEDLVFDILDDLKGKTKSHRYKNEDIT      80
FDHPFSAMYPYPSVSGSGIKIXNTLVFLGYGGLTTPLQGNTKCVINRCPNVNQSVCNDALKITWLKKRQVVNVLIRINNYLS      160
  
```

A) Resultado gráfico da análise preditiva de N-glicosilação, no qual foram identificados como potenciais sítios os resíduos de Asparagina presentes nas posições, 8, 19, 173, 277, 361, 499, 504. B) Sequência de aminoácidos da proteína HN. Os motivos para N-glicosilação, Asn-X-Ser/Thr, estão em azul e os resíduos de Asparaginas (N) preditas como sítios de N-glicosilação estão em vermelho. Sequência selecionada pelo em amarelo refere-se ao fragmento da hemaglutinina avaliado em nosso estudo. C) Avaliação dos sítios de N-glicosilação das amostras brasileiras. Caixa em verde na amostra BR_1995_136 refere-se ao sítio preditivo de N-glicosilação perdido pela substituição da Asparagina pela Tirosina.

Fonte: Perini (2012).

4.5 Reconstruções filogenéticas

Para a comparação das cepas brasileiras com as cepas circulantes em outras localidades, as sequências obtidas do gene HN de cada um dos HPIVs foram alinhadas com as sequências depositadas no *GeneBank* e submetidas a uma análise filogenética pelo critério de distâncias evolutivas.

Inicialmente, foi realizada uma análise do conjunto de dados para cada subtipo individualmente, envolvendo o teste de razão de verossimilhança. Para HPIV-1, o modelo de substituição de nucleotídeos que melhor explicaria as relações evolutivas entre as sequências foi o HKY+G (Hasegawa, Kishino, Yano com distribuição gama), no qual o coeficiente de distribuição gama obtido foi 0.4464 (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985).

A topologia da árvore proposta para as amostras de HPIV-1, pelo método de distância evolutiva, está representada na figura 20. As sequências de HPIV-1 foram agrupadas em 4 *clusters* diferentes, três deles correspondentes aos genótipos A (contendo amostras anteriores à década de 1980), C (contendo sequências a partir de 1991 até 2005) e D (com amostras de 1989 a 1991), caracterizados por HENRICKSON e SAVATSKI (1996). Algumas sequências obtidas do Genbank não foram agrupadas nos clusters acima descritos (Washington 1964, Cordoba, 1967, C39 e C35). As sequências brasileiras, embora circulassem em anos distintos, foram agrupadas, no mesmo clado, juntamente com sequências pertencentes ao genótipo C. A classificação das amostras brasileiras dentro deste genótipo foi confirmada pela presença de alterações características, tanto em nível de aminoácidos como em nível de nucleotídeos, em relação à sequência protótipo, assinaladas no quadro 7 (HENRICKSON e SAVATSKI, 1996).

Figura 20 - Topologia da árvore obtida pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo *Neighbor Joining* das amostras brasileiras de HPIV-1.

Amostras brasileiras destacadas em vermelho. Os números entre parênteses indicam o número de sequências idênticas. () indicam quantidade de sequências idênticas analisadas mas não descritas na árvore – ANEXO G.

Fonte: Perini (2012).

Para o HPIV-2 o modelo evolutivo escolhido foi HKY+G, com valor de distribuição gama de 0.2447. A figura 21 representa a topologia da árvore do HPIV-2, obtida pelo método de distâncias evolutivas. Foram observados dois clusters distintos. Um contendo sequências mais antigas de regiões distintas, circulantes nas décadas de 1960 a 1980 e o outro contendo amostras circulantes entre as décadas de 1980 e 2000, indicando aparentemente uma distribuição temporal e não geográfica. A sequência brasileira, no entanto, pareceu não seguir esta tendência.

Figura 21 - Topologia da árvore obtida pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo *Neighbor Joining* das amostras brasileiras de HPIV-2.

Amostras brasileiras destacadas em vermelho. Os números entre parênteses indicam o número de sequências idênticas analisadas, mas não descritas na árvore (ANEXO H).
 Fonte: Perini (2012).

Para HPIV-3, o modelo de substituição de nucleotídeos que melhor explicaria as relações evolutivas entre as sequências foi o TIM+G, no qual o coeficiente de distribuição gama obtido foi 0.4225. A figura 22 representa a topologia da árvore obtida, na qual as sequências brasileiras agrupam-se em dois *clusters* conforme o ano de isolamento. Um contendo as sequências brasileiras do ano de 2000 até 2005 e sequências de outras regiões até o ano de 2009 e a outra contendo as sequências de 1995 até 1999, demonstrando também uma variação preferencialmente temporal do que geográfica, uma vez que as cepas de diferentes localidades agruparam-se no mesmo *cluster*.

Figura 22 - Topologia da árvore obtida pelo método de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo *Neighbor Joining* das amostras brasileiras de HPIV-3.

Amostras brasileiras destacadas em vermelho. Os números entre parênteses indicam o número de sequencias idênticas. () indicam o número de seqüências idênticas analisadas, porém não descritas na árvore (ANEXO I).

Fonte: Perini (2012).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi um estudo sobre a circulação dos HPIVs em crianças atendidas no hospital universitário da Universidade de São Paulo, com doença respiratória aguda, no decorrer de 11 anos consecutivos. Em um total de 6% das amostras analisadas foi detectado um dos parainfluenzavírus. Estes dados concordam com os da literatura que descrevem uma prevalência de 2,5 a 10% destes vírus na população infantil (EDERMAN et al., 2003; IWANE et al., 2004; RUUSKANEN et al., 2011; SRIVASAN et al., 2011). Dentre as amostras positivas verificamos que o HPIV-3 foi detectado em 9 dos 10 anos estudados (de 1995 a 2005, com exceção de 1997) sendo o mais frequente, correspondendo a 80% dos casos (111/135), seguido pelo HPIV-1, correspondendo a 13% (17/135) e HPIV-2 correspondendo a 5% (7/135). Estes dados foram semelhantes aos encontrados por Srivasan et al. (2011), que ao avaliar as infecções por HPIV em uma unidade de crianças transplantadas durante 15 anos, também observou uma maior frequência de HPIV-3 seguido pelo HPIV-1 e HPIV-2. Akinloye et al. (2011), em seu estudo com crianças Nigerianas, também observaram a prevalência do HPIV-3 em relação aos demais sorotipos. Por se tratar de um estudo retrospectivo, devemos ressaltar que os dados obtidos referentes à frequência de positividade bem como de sazonalidade, devem ser avaliados cautelosamente, pois podem não representar a real circulação desses vírus no período estudado. Dificuldades tanto em recuperar os dados de coleta de todas as amostras, bem como limitações técnicas (volume insuficiente de amostras, presença de possíveis interferentes em amostras e repetidos ciclos de congelamento e descongelamento) ocorreram impedindo a utilização de todas as amostras colhidas no período. Entretanto foi possível verificar que a maior positividade para os HPIVs em nossa casuística ocorreu em crianças com até um ano idade, corroborando com dados da literatura que reportam maiores taxas de internação por infecção por estes vírus nesta faixa etária (IWANE et al., 2004).

Embora o HPIV-3 tenha sido o vírus mais comumente detectado entre as amostras estudadas, não foi possível, devido aos problemas com a casuística, reforçar os dados da literatura que indicam o HPIV-3 como o mais prevalente entre as crianças com idade até 6 meses, e os vírus 1 e 2 ocorrendo em crianças maiores (BROOR et al., 2007; HSIEH et. al, 2010; KNOTT et al., 1994).

Um estudo brasileiro com amostras da região nordeste do Brasil, reportou a ocorrência de HPIV-3 entre os meses de setembro a novembro (Fé et al., 2008). Em estudo semelhante

que avaliou as infecções por HPIV durante 15 anos em unidade de transplantados, Srivasan et al. (2011), relataram a ocorrência anual de HPIV-3, e bianual de HPIV-1 e HPIV-2. No presente estudo também foi observada a ocorrência anual de HPIV-3, entretanto não foi possível a observação de surtos bianuais de HPIV-2 ou de HPIV-1. Observamos apenas que estes dois vírus realmente não foram detectados em todos os anos estudados.

Na etapa de amplificação do fragmento do gene HN das amostras positivas para HPIV, previamente detectadas e tipadas no processo de triagem, houve êxito na amplificação de apenas 42 das 135 inicialmente detectadas como positivas. Tivemos problemas de amplificação em 55 amostras. A falha na amplificação destas amostras pode ter ocorrido como consequência de inúmeros fatores, tais como presença de algum agente inibidor, degradação do RNA (DWYER et al., 2006; LANDRY, 2011) ou falha nos *primers*. Embora as amostras utilizadas neste estudo tenham sido colhidas e processadas de maneira recomendada para o diagnóstico de vírus respiratórios (MYAO et al., 1999), as mesmas ficaram armazenadas por longo período a -70°C , algumas por mais de 10 anos, e foram utilizadas em vários projetos, tendo sofrido, portanto, alguns ciclos de congelamento e descongelamento, tanto das amostras clínicas quanto do cDNA sintetizado. Em estudo realizado por Halfon et al., em 1996, foi descrita uma queda de cerca de 10% no título do vírus da Hepatite C em amostras sabidamente positivas congeladas a -80°C . Quando essas amostras foram submetidas a 5 ciclos de descongelamento a diminuição dos títulos pode chegar a 16% (HALFON et al., 1996). Outro estudo realizado por Frisbie et al. (2004) verificou uma queda de 20% na sensibilidade da RT-PCR para detecção de *Influenzavirus* em amostras congeladas a -70°C em comparação às amostras clínicas recém colhidas. Os autores atribuíram a degradação do ácido nucléico como causa da diminuição de positividade das amostras.

Apesar dos *primers* utilizados neste estudo, tanto para a detecção como para a amplificação do gene HN serem clássicos na literatura (ECHEVARRÍA, et al., 1998, 2000; ERDMAN, et al., 2003; TEMPLETON et al., 2004; THOMAZELLI et al., 2002), estes foram desenhados há mais de 10 anos por Echevarría et al., 1998, baseando-se em sequências de 27 amostras de HPIV-1, 2 de HPIV-2 e 10 de HPIV-3, todas obtidas do Genbank, embora os números de acesso não estejam descritos. A padronização das reações de amplificação, realizada por Echevarría (1998), utilizou amostras protótipo de cada HPIV (C-35 de HPIV-1, Greer de HPIV-2 e C-243 de HPIV-3) e diversas amostras clínicas isoladas em locais e anos diversos: HPIV-1 [Córdoba- Argentina (1974), Massachusetts (1985), Oregon (1974), Nevada (1985)], HPIV2 [Califórnia (1980), Massachusetts (1971), Connecticut (1977), e Kansas

(1982)] e HPIV3 [Idaho (1977), Alabama (1979), Oregon (1981), e Manitoba, Canada (1981)]. Portanto, ressaltasse que todas as amostras utilizadas no desenvolvimento e validação da reação são de anos anteriores às amostras avaliadas em nosso estudo. Por não haver dados referentes às sequências destas amostras descritas no trabalho de Echevarría et al. (1998), não foi possível avaliar se existem possíveis diferenças entre elas e nossas amostras, que poderiam levar a uma falha na detecção.

No trabalho de Echevarría et al. (2000), a variabilidade genética em nível de nucleotídeos do gene HN dos parainfluenzavirus, foi em torno de 6%, que embora moderada pode contribuir para diminuição da especificidade e, conseqüentemente, da sensibilidade da técnica, gerando resultados falso negativos. Além deste fato, pode ter ocorrido também uma falha na triagem das amostras realizadas com os *primers* PIS, que poderiam ter amplificado fragmentos que não seriam de parainfluenzavirus. Para eliminação desta última hipótese, o ideal seria sequenciar os fragmentos obtidos na triagem destas amostras que não amplificaram, entretanto, não foi possível pois o *primer* com sentido positivo é marcado com FAM.

Embora tenham sido observadas diversas alterações de nucleotídeos nos três tipos de parainfluenza, a maioria das mutações foi silenciosa. Foram encontradas nas amostras de HPIV-3, 31 alterações de aminoácido, sendo que 6 se reproduziram em pelo menos duas amostras: substituição Ser383Pro (ocorrido em todas amostras de 1995); Ser367Pro (nas amostras Br_2000_09 e Br_2004_349); Ala348Val (Br_1999_154; Br_1999_101; Br_1999_149); His295Tyr (ocorrido em todas, com exceção das amostras de 1995); Asn240Ile (Br_2003_238 e Br_2004_349); Ser369Arg (Br_1999_154 e Br_1999_151). Não foram encontrados relatos de alteração na função da proteína em virtude dessas substituições, entretanto Coeling et al. (1987) reportaram que a substituição de Ser para Asn no resíduo 369, verificado em duas amostras estava correlacionada com a inibição da função de hemaglutinação.

Entre as 3 amostras de HPIV-1 sequenciadas, foram verificadas 6 mutações não silenciosas, sendo que as substituições nos resíduos 335 (Ile→Val), 349 (Asp→Asn), 358 (Thr→Pro) se repetiram nas três amostras. Alterações em relação à cepa protótipo nestas posições foram descritas como características do genótipo C (Henrickson e Savatski, 1996). Porém, não foram encontrados relatos na literatura a respeito de alterações funcionais da proteína nem a alteração de sítios antigênicos relacionadas à essas modificações.

Dentre os parainfluenzas 1, 2 e 3 certamente o HPIV-2 é o vírus que apresenta menor número de sequências publicadas. Em nossa casuística, embora tenhamos detectado 7 amostras positivas, obtivemos êxito na amplificação e sequenciamento do fragmento da HN de apenas uma amostra, na qual foi observado um grande número de substituições de nucleotídeos em relação à amostra GREER-J-1, correspondendo a 5,7% de substituições o que fica bastante evidente na topologia da árvore filogenética gerada. Esta porcentagem foi maior que a descrita por Terrier et al. (2008) que descreveram um índice de 4,6% ao estudar o gene HN de 5 amostras de HPIV-2 que apresentavam características antigênicas e fenotípicas distintas da amostra considerada protótipo. Esta alta variabilidade pode ter sido a causa do insucesso na amplificação do gene HN de 6 amostras positivas pela triagem. Ao contrário do HPIV-1, cerca de 70% das substituições foram não silenciosas, gerando uma alta variabilidade também em nível de aminoácidos. Entretanto, embora a variabilidade antigênica entre os HPIV-2 seja conhecida pela diferença de reatividade com painel de anticorpos monoclonais (RAY et al., 1992), poucos dados sobre a localização exata dos sítios antigênicos estão descritos na literatura (MIRZA et al., 1994; TERRIER et al., 2008) o que dificulta a correlação das substituições encontradas com possíveis alterações antigênicas.

Como o número de sequências de HPIV-2 disponível é pequeno e apenas uma sequência foi obtida não foi possível estabelecer um padrão de circulação do vírus em nosso meio.

Embora nenhuma das alterações dos 3 HPIVs citadas acima possam ser correlacionadas com mutações importantes descritas na literatura que indicassem alterações antigênicas, e/ou perda de função da proteína HN, foram constatadas algumas substituições pontuais em regiões conservadas da proteína HN dos *Paramyxovirus* em algumas amostras. Quatro amostras, 3 de HPIV-3 (Br_1999_154; Br_1999_101; Br_2004_349) e uma de HPIV-2 (Br_2000_59) apresentaram mutações na região NRKSCS (que corresponde aos resíduos de aminoácidos 252 a 257 nos HPIV-3 e 260 a 265 nos HPIV-2), que é a maior região conservada da glicoproteína HN entre os vírus pertencentes à Família *Paramyxoviridae* (CRENNELL et al., 2000; MIRZA et al., 1994). Esta região faz parte do sítio ativo da neuraminidase e mutações nesta região são aparentemente responsáveis por alterações na arquitetura do sítio e da topologia da proteína, resultando em alterações na estrutura antigênica e na habilidade da proteína HN participar da formação de sincícios (MIRZA et al., 1994). Ressalta-se que dentre as alterações encontradas nesta região, as substituições do aminoácido Lys na posição 254

da HN do HPIV-3 por Gln e Lys na posição 262 da HN do HPIV-2 para Glu, foram descritas por Mirza et al. (1994) como relacionadas com a redução da atividade de neuraminidase, sendo que esta atividade é reduzida a menos de 1% quando esta substituição é de Lys para Glu. Mirza et al. (1994), reportaram também uma menor taxa de reconhecimento pelo MAb específico para o sítio antigênico 23, nas mutações de Lys→Glu e Lys→Gln ocorridas na região NRKSCS, e diminuição de 50% na capacidade de formação de sincícios em amostras com a mutação Lys→Glu. Estas duas mutações foram observadas em duas amostras brasileiras [HPIV_2 Br_2000_59 (Lys262Glu) e HPIV_3 Br_1999_101(Lys254Gln)].

Outras substituições foram observadas em amostras de HPIV em outras posições conservadas entre os *Paramyxovirus*: Cys269Val (amostra Br_2003_345); Cys335GlnQ (Br_2005_336) e Glu252Val (Br_2000_59), entretanto não foram encontrados dados a respeito de possíveis consequências destas alterações. Diversas substituições pontuais em outras regiões da proteína foram encontradas, entretanto a princípio sem correlações com alterações na atividade da proteína HN.

Outro dado interessante foi a substituição Ser316Asn na amostra brasileira de HPIV-2, Br_2000_059, que gerou um novo sítio de N- glicosilação, quando comparada como a amostra padrão a Greer-J1 (número de acesso Genbank AB367954.1) e a perda do sítio localizado na posição 361 (Asn361Tyr) na amostra de HPIV-1, Br_1995_136, quando comparada com a cepa Washington 1964.

A N-glicosilação ocorre quando um oligosacarídeo liga-se covalentemente ao grupo NH₂ das Asparquinas presentes no polipeptídeo nascente formando uma cadeia lateral. Esta ligação ocorre nas sequências Asn-X-Thr ou Asn-X-Ser, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto ácido aspártico ou prolina. Esse processo ocorre no retículo endoplasmático rugoso das células hospedeiras e influencia muitas propriedades das glicoproteínas como sua conformação, manutenção da estabilidade e solubilidade, transporte da proteína, sua antigenicidade e imunogenicidade (PANDA et al., 2004). Entretanto, nem todos os sítios consenso (Asn-X-Thr e Asn-X-Ser) são modificados pela glicosilação, não sendo claramente ainda compreendidas quais outras características na sequência da proteína primária, ou na formação das estruturas intermediárias determinam ou impedem a utilização desses sítios para a glicosilação (HIERBERT ; LAMB, 1990).

Palomo et al., (1991) demonstraram que as glicosilações tipo N- ou O- afetam a ligação dos anticorpos a proteína. Portanto, é possível que o impacto da diferença entre as cepas do vírus, em nível de aminoácido, seja amplificado pela mudança nos sítios de

glicosilação, sugerindo uma vantagem seletiva para o vírus, seja pela geração de progênie viral mais resistente à neutralização por anticorpos ou pela alteração de sítios antigênicos devido à adição de novos sítios de glicosilação. No caso do HPIV-2 a adição do sítio ocorreu em um *loop* localizado na superfície da proteína, podendo, portanto, corresponder a um sítio antigênico (TERRIER et al., 2008).

O resultado da análise filogenética das amostras de HPIV-1 concordam com os dados previamente reportados por Mizuta et al. (2011) e Henrickson e Savatski (1996) demonstrando que a proteína HN dos HPIV-1 é conservada, apresentando poucas substituições de nucleotídeos nos anos estudados (distância par a par entre as sequências brasileiras foi baixa, em torno de 0,012). Estes dados foram semelhantes aos obtidos por Mizuta e colaboradores (2011), cuja média foi de 0,018. Portanto, as amostras brasileiras, embora circulantes em anos distintos, foram agrupadas no mesmo clado dentro do mesmo genótipo, C, que contém sequências obtidas nas décadas de 1990 até 2000 e de várias regiões do mundo. Nenhuma das sequências brasileiras foi classificada dentro dos genótipos A (que compreende amostras da década de 1960) e D (amostras das décadas de 1980 e 1990). Estes dados são indicativos que o padrão de circulação das linhagens de HPIV-1 tende a ser temporal. Porém, nota-se que dentro de um mesmo genótipo as linhagens circulantes em um mesmo país tendem a se agrupar. Heterington et al. (1994), descreveram que a evolução de linhagens de HPIV1 pode estar relacionada à localização geográfica, porém mais dados são necessários para o estabelecimento da evolução destes vírus.

Embora o HPIV-3 seja o mais estudado, há poucos trabalhos de filogenia relacionando a variabilidade genética do vírus com a epidemiologia. Em um trabalho recente que também utilizou a proteína HN do HPIV-3 como alvo, Almajhdi et al. (2012), compararam as amostras colhidas em 2008 e 2009 provenientes da Arábia Saudita com sequências publicadas oriundas do Japão, China e Índia encontrando grande similaridade entre elas. Nesse trabalho as amostras provenientes do continente asiático foram separadas em dois clusters, referidos como linhagem A1 e A2. Outro trabalho caracterizou geneticamente, pelo sequenciamento do gene HN, as cepas que ocasionaram surtos em uma Unidade de Oncohematológica Pediátrica na Itália, e verificaram que 4 linhagens diferentes foram responsáveis por cada um dos surtos ocorridos (PIRALLA et al., 2009). A análise filogenética das sequências geradas no presente trabalho permitiram a divisão das amostras brasileiras em 2 diferentes *clusters*.

Os dois maiores *clusters* compreenderam sequências de amostras brasileiras e sequências de várias regiões do mundo. O *cluster* 1, que agrupou sequências circulantes entre os anos de 2000 a 2009, apresentou, além das sequências brasileiras, sequências Asiáticas pertencentes à linhagem A1 descrita, por Almajhdi et al. (2012), e uma sequência americana. Por outro lado, o *cluster* 2 apresentou preferencialmente sequências brasileiras e americanas, porém todas circulantes na décadas de 1980 e 1990. Podemos inferir, portanto que a epidemiologia dos HPIV-3 no presente estudo caracterizou-se pela co-circulação de diferentes linhagens em um mesmo ano, assim como a circulação de uma mesma linhagem em anos diferentes e que pode ocorrer a persistência de uma mesma linhagem no decorrer dos anos.

Os HPIVs representam importantes patógenos causadores de doença respiratória, principalmente na primeira infância, entretanto, muito pouco ainda é conhecido sobre sua circulação e padrão evolutivo. Neste trabalho ficou evidenciado a pouca quantidade de estudos publicados a respeito da variabilidade genética destes vírus, principalmente envolvendo dados brasileiros. O presente trabalho apresenta importantes dados, provavelmente inéditos, sobre a variabilidade genética dos vírus circulantes em um hospital da cidade de São Paulo durante 10 anos, sendo um primeiro passo para o conhecimento do padrão evolutivo bem como das cepas de HPIV circulantes em nosso território. Trabalhos posteriores envolvendo um maior número de amostras e que sejam representativas das diversas regiões do Brasil são necessários para a caracterização do padrão de amostras circulantes, o que sem dúvida é importante para o desenvolvimento de testes diagnósticos e de vacinas eficazes.

6 CONCLUSÕES

- A porcentagem de positividade para os HPIVs em crianças com síndrome respiratória aguda, atendidas em unidade hospitalar na cidade de São Paulo foi de 6%, sendo o HPIV-3 mais frequentemente detectado.
- As amostras de HPIV-1 brasileiras apresentaram baixa diversidade genética entre si, mas mostrou-se mais elevada em relação à amostra protótipo isolada em 1957. 72,7% das substituições foram silenciosas.
- Durante 10 anos houve a circulação de um genótipo de HPIV-1 indicando uma baixa variabilidade da proteína HN, estabilidade das alterações no decorrer do tempo, porém com padrão de circulação temporal das linhagens.
- A amostra brasileira de HPIV-2 apresentou 31 alterações no fragmento de 485 nucleotídeos avaliado em relação à cepa protótipo isolada em 1955 das quais 74,1% foram mutações não silenciosas.
- Entre os HPIV-3 a média de mutação foi de 6 % aa e 19 % ao nível de aminoácidos e nucleotídeos, respectivamente.
- Algumas alterações verificadas no HPIV-3 e no HPIV-2 ocorreram em regiões que são conservadas entre os vírus pertencentes à Família *Paramyxoviridae*, com principal destaque as substituição da Lisina da região conservada NRKSCS (posições 254 do HPIV-3 e 262 do HPIV-2), na qual são relatadas importantes alterações antigênicas e de função da proteína HN.
- Foram verificadas duas importantes alterações em sítios preditivos de N-glicosilação, uma adição (amostra BR_2000_059) e uma perda (amostra Br_1995_136).
- A epidemiologia dos HPIV-3 caracterizou-se pela co-circulação de diferentes linhagens em um mesmo ano, assim como a circulação de uma mesma linhagem em anos diferentes e que pode ocorrer a persistência de uma mesma linhagem no decorrer dos anos.

REFERÊNCIAS¹

AKINLOYE O. M.; R'ONKK'O, E.; SAVOLAINEN-KOPRA, C.; ZIEGLER, T.; IWALOKUN, B. A.; DEJI-AGBOOLA, M. A.; OLUWADUN, A.; ROIVAINEN, M.; ADU, F. D.; HOVI, T. Specific Viruses Detected in Nigerian Children in Association with Acute Respiratory Disease **J. Trop. Med.**, v. 2011, p. 1-6, 2011. ARTICLE ID 690286.

ALMAJHDI, F. N.; ALSHAMAN, M. S.; AMER, H. M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of human parainfluenza virus type 3 isolated from Saudi Arabia. **J. Med. Virol.**, v. 84, p. 1204-1311, 2012.

ALYMOVA, I. V.; WATANABE, M.; BOYDE, K. L.; CHAND, P.; BABU, Y. S.; PORTNER, A. Efficacy of a novel hemagglutinin-Neuraminidase inhibitors BCX 2798 in mice – Further evaluation. **Antivir. Ther.**, v. 14, n. 7, p. 891-898, 2009.

ALYMOVA, I. V.; TAYLOR, G.; TAKIMOTO, T.; LIN, T.; CHAND, P.; BABU, Y. S.; LI, C.; XIONG, X.; PORTNER. Efficacy of a novel hemagglutinin-Neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 against Human Parainfluenza Viruses In Vitro and In Vivo. **Antimicrobial agents and Chem.**, v. 48, n. 5, p. 1495-1502, 2004.

ANDREWES, C. H.; BANG, M. B.; CHANOCK, R. M.; ZHDANOV, B. M. Parainfluenza 1, 2 e 3: suggested names for recently described myxoviruses. **Virology**, v. 8, p. 129-130, 1959.

BOSE, S.; MALUR, A.; BANERJEE, A. K. Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: Role of microfilament and microtubule. **J. Virol.**, v. 75, n. 4, p. 1984-1989, 2001.

BOURGEOIS, F. T.; VALIM, C.; WEI, J. C.; MCADAM, A. J.; MANDL, K. D. Influenza and other respiratory virus-related emergency department visits among young children. **Pediatrics**, v. 118, p. e1-e8, 2006.

BRADY, M. T.; EVANS, J.; CUARTAS, J. Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces. **Am. J. Infect. Control**, v. 18, p. 18–23, 1990.

BROOR, S.; PARVEEN, S.; BHARAJ, P.; PRASAD, V. S.; SRINIVASULU, K. N.; SUMANTH, K. M.; KAPOOR, S. K. FOWLER, K.; SULLENDER, W. M. A Prospective Three-Year Cohort Study of the Epidemiology and Virology of Acute Respiratory Infections of Children in Rural India. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e491, 2007.

CARBALLAL, G.; VIDELA, C. M.; ESPINOSA, A.; SAVY, V.; UEZ, O.; SEQUERA, M. D. ; KNEZ, V.; REQUEIJO, P. V.; POSSE, C. R.; MICELI, I. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993– 1994. **J Med. Virol.**, v. 64, p. 167–174, 2001.

CHANOCK, R. M., Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. **J. Exp. Med.**, v. 104, p. 555-576, 1956.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências; elaboração. Rio de janeiro, 2002.

CHANOCK, R. M.; MCINTOSH, K. Parainfluenza viruses. In: FIELDS, B. N. et al. (Ed.). **Virology**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1985. p. 1241-1270.

CHANOCK, R. M.; PARROT, R. H.; COOK, K.; ANDREWS, B. E.; BELL, J. A.; REICHELDERFER, T.; KAPIKIAN, A. Z.; MASTROTA, F. M.; HUEBNER, R. J. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 258, p. 207-213, 1958.

CHANOCK, R. M.; PARROTT, R. H. Acute respiratory disease in infancy and childhood: present understanding and prospects for prevention. **Pediatrics**, v. 36, p. 21-39, 1965.

CHANOCK, R. M.; VARGOSKO, A.; HUEBNER, R. J.; LUCKEY, A.; KIM, H. W.; CUMMING, C.; PARROT, R. H. Association of type 2 hemadsorption (parainfluenza 1) virus and Asian influenza A virus with infectious croup. **N. Engl. J. Med.**, v. 261, n. 1, p. 1-9, 1959.

COELING K. V. W.; TIERNEY, E. L. Antigenic and functional organization of human parainfluenza virus type 3 fusion glycoprotein. **J. Virol.**, v. 63, n. 1, p. 375-82, 1989.

COELING K. V. W.; WINTER, C. C.; JORGENSEN, E. D.; MURPHY, B. R. Antigenic and structural properties of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3: sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies which inhibit infectivity, hemagglutination, and neuraminidase activities. **J. Virol.**, v. 61, n. 5, p. 1473-1477, 1987.

COELINGH, K. L. Antigenic variation among human parainfluenza type 3 viruses: Comparative and epidemiologic aspects. In: KURSTAK, E. et al. (Ed.). **Applied virology research: virus variation**. New York: Plenum Press, 1989. p. 143-157.

CONNOLLY, S. A.; LESER, G. P.; JARDETZKY, T. S.; LAMB, R. A. Bimolecular complementation of paramyxovirus fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins enhances fusion: implications for the mechanism of fusion triggering. **J. Virol.**, v. 83, n. 21, p. 10857-10868, 2009.

CORONEL, E. C.; TAKIMOTO, T.; MURTI, K. G.; VARICH, N.; PORTNER, A. Nucleocapsid Incorporation into Parainfluenza Virus is Regulated by Specific Interaction with Matrix Protein. **J. Virol.**, v. 75, n. 3, p. 1117-1123, 2001.

CRENNELL, S.; TAKIMOTO, T.; PORTNER, A.; TAYLOR, G. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, n. 11, 2000.

DENNY, F. W.; CLYDE JR, W. A. Acute lower respiratory infections in nonhospitalized children. **J. Pediatr.**, v. 108, p. 635-646, 1986.

DWYER, D. E.; MCPHIE, K. A.; RATNAMOHAN, V. M.; PITMAN, C. N. Challenges for the laboratory before and during an influenza pandemic. **N.S.W. Public Health Bull.**, v. 17, n. 9-10, p. 142-145, 2006.

ECHEVARRÍA, J. E.; ERDMAN, D. D.; MEISSNER, C.; ANDERSON, L. Rapid molecular epidemiologic studies of human parainfluenza viruses based on direct sequencing of amplified DNA from a multiplex RT-PCR assay. **J. Virol. Methods**, v. 88, p. 105–109, 2000.

ECHEVARRIA, J.; ERDMAN, D. D.; SWIERKOSZ, E. M.; HOLLOWAY, B.P.; ANDERSON, L. J. Simultaneous Detection and identification of human Parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 5, p. 1388-1391, 1998.

ERDMAN, D. D.; WEINBERG, G. A.; EDWARDS, K. M.; WALKER, F. J.; ANDERSON, B. C.; WINTER, J. R.; GONZALEZ, M.; ANDERSON, L. J. GeneScan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Six Common Respiratory Viruses in Young Children Hospitalized with Acute Respiratory Illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 4298-4303, 2003.

FÉ, M. M.; MONTEIRO, A. J.; MOURA, F. E. Parainfluenza vírus infections in a tropical city; clinical and epidemiological aspects. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 3, p. 192-197, 2008.

FRAYHA, J.; CASTRICIANO, S.; MAHONY, J.; CHENESKY, M. Nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal aspirates equally effective for the diagnosis of viral respiratory disease in hospitalized children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 1387–1389, 1989.

FRISBIE, B.; TANG, Y. W.; GRIFFIN, M.; POEHLING, K.; WRIGHT, P. F.; HOLLAND, K.; EDWARDS, K. M. Surveillance of childhood influenza virus infection: what is the best diagnostic methods to use for archival samples? **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 1181-1184, 2004.

FUENTES, S. M.; SUN, D.; SCHMITT, A. P.; HE, B. Phosphorylation of paramyxovirus phosphoprotein and its role in viral gene expression. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 9-13, 2010.

GARDNER, A. E.; DUTCH, R. E. A Conserved Region in the F2 Subunit of Paramyxovirus Fusion Proteins Is Involved In Fusion Regulation. **J. Virol.**, v. 81, n. 15, p. 8303–8314, 2007.

GLEZEN, W. P.; GREENBERG, S. B.; ATMAR, R. L.; PIEDRA, P. A.; COUGH, R. B. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. **JAMA**, v. 283, p. 499–505, 2000.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. 2004. In preparation.

HALFON, P.; KHIRI, H.; GEROLAMI, V.; BOURLIERI, M.; FERYN, J. M.; REYNIER, P.; GAUTHIER, A.; CARTOUZOU, G. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. **J. Hepatol.**, v. 25, n. 3, p. 307-311, 1996.

HARRISON, M. S.; SAKAGUCHI, T., AND SCHMITT, A. P. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. **The Inter. Journal of Biochem. Cell Biol.**, v. 42, p. 1416-1429, 2010.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.** v. 22, n. 2, p. 160–174, 1985

HEIKKINEN, T.; MARTTILA, J.; SALMI, A. A.; RUUSKANEN, O. Nasal Swab versus Nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 4337–4339, 2002.

HENRICKSON, K. J. Monoclonal antibodies to human parainfluenza virus type 1 detect major antigenic changes in clinical isolates. **J. Infect. Dis.**, v. 164, n. 6, p. 1128–1134, 1991.

HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Two Distinct Human Parainfluenza Virus Type 1 Genotypes Detected during the 1991 Milwaukee. **Epidemic. J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 3, p. 695–700, 1996.

HENRICKSON, K. J. Human parainfluenza viruses. In: LENNETTE, E. H. (Ed.). **Laboratory diagnosis of viral infections**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 665–702.

HENRICKSON, K. J. Parainfluenza viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 242–264, 2003.

HETHERINGTON, S. V.; WATSON, A. S.; SCROGGS, R. A.; PORTNER, A. Human parainfluenza virus type 1 evolution combines cocirculation of strains and development of geographically restricted lineages. **J. Infect. Dis.**, v. 169, n. 2, p. 248–252, 1994.

HOMMA, M.; OHUCHI, M. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural differences of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. **J. Virol.**, v. 12, p. 1457–1463, 1973.

HSIEH, Y.; HSIN, C.; CHIU, N.; HUANG, F. Hospitalized Pediatric Parainfluenza Virus in a Medical Center. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 43, n. 5, p. 360–365, 2010.

IWANE, M. K.; EDWARDS, K. M.; SZILAGYI, P. G.; WALKER, F. J.; GRIFFIN, M. R.; WEINBERG, G. A.; COULEN, C.; POEHLING, K. A.; SHONE, L. P.; BALTER, S.; HALL, C. B.; ERDMAN, D. D.; WOOTEN, K.; SCHWARTZ, B. New Vaccine Surveillance Network. Population-Based Surveillance for Hospitalizations Associated With Respiratory Syncytial Virus, Influenza Virus, and Parainfluenza Viruses Among Young Children. **Pediatrics**, v. 113, n. 65, p. 1758–1764, 2004.

JALAL, H.; BIBBY, D. F.; BENNETT, J.; SAMPSON, R. E.; BRINK, N. S.; MACKINNON, S.; TEDDER, R. S.; WARD, K. N. Molecular Investigations of an Outbreak of Parainfluenza Virus Type 3 and Respiratory Syncytial Virus Infections in a Hematology Unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1690–1696, 2007.

JONES, B.; ZHAN, X.; MISHIN, V.; SLOBOD, K. S.; SURMAN, S.; RUSSEL, C. J. PORTNER, A. HURWITZ, J. Human PIV-2 Recombinant Sendai Virus (rSeV) Elicits Durable Immunity and combines with two additional rSeVs to protect against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1848–1857, 2009.

KARRON, R. A.; COLLINS, P. L. Parainfluenza viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5th ed. New York: Raven Press Ltd, 2007. p. 1502-1526.

KAWANO, M.; BANDO, H.; YUASA, T.; KONDO, K.; TSURUDOME, M.; KOMADA, H.; NISHIO, M.; ITO, Y. Sequence determination of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of human parainfluenza type 2 virus and the construction of a phylogenetic tree for HN proteins of all the paramyxoviruses that are infectious to humans. **Virology**, v. 174, n. 1, p. 308-313, 1990.

KAWANO, M.; OKAMOTO, K.; BANDO, H.; KONDO, K.; TSURUDOME, M.; KOMADA, H.; NISHIO, M.; ITO, Y. Characterizations of the human parainfluenza type 2 virus gene encoding the L protein and the intergenic sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 19, p. 2739-46, 1991.

KHAN J. S. Epidemiology of human metapneumovirus. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 19, n. 3, p. 546-547, 2006.

KIM, H. W.; VARGOSKO, A. J.; CHANOCK, R. M.; PARROT, R. H. Parainfluenza 2 (ca) virus etiologic association with croup. **Pediatrics**, v. 28, p. 614-621, 1961.

KING, A. M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 2011. Available from <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>>. Acesso em: 02 Feb. 2012.

KNOTT, A. M.; LONG, C. E.; HALL, C. B. Parainfluenza viral infections in pediatric outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 269-273, 1994.

KOMADA, H.; KUSAGAWA, S.; ORVELL, C.; TSURUDOME, M.; NISHIO, M.; BANDO, H.; KAWANO, M.; MATSUMURA, H.; NORRBY, E.; ITO, Y. Antigenic diversity of human parainfluenza virus type 1 isolates and their immunological relationship with Sendai virus revealed by using monoclonal antibodies. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 875-884, 1992.

KOMADA, H.; ORSTAVIK, I.; ITO, Y.; NORRBY, E. Strain variation in parainfluenza virus type 4. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 1581-1583, 1990.

LANDRY, M. L. Diagnostic tests for influenza infection. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 23, n. 1, p. 91-97, 2011.

LANGEDIJK, J. P.; DAUS, F. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. **J. Virol.**, v. 71, p. 6155-6167, 1997.

LAU, S. K. P.; TO, W.; TSE, P. W.; CHAN, A. K. H.; WOO, P. C. Y.; TSOI, H.; LEUNG, A. F. Y.; LI, K. S. M.; CHAN, P. K. S.; LIM, W. W. L.; YUNG, R. W. H.; CHAN, K.; YUEN, K. Human Parainfluenza Virus 4 Outbreak and the Role of Diagnostic Tests. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 9, p. 4515-4521, 2005.

LAWRENCE, M. C.; BORG, N. A.; STRELTSOV, V. A.; PILLING, P. A.; EPA, V. C.; VARGHESE, J. N.; McKIMM-BRESCHKIN, J. L.; COLMAN, P. M. Structure of

Haemagglutinin-neuraminidase from human Parainfluenza Virus Type III. **J. Mol. Biol.**, v. 335, p. 1343-1357, 2004.

LE BAYON, J.; LINA, B.; CALATRAVA, M.; BOIVIN, G. Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines. **Rev. Med. Virol.**, In press 2012.

LUQUE, L. E.; BRIDGES, O. A.; MASON, J. N.; BOYD, K. L.; PORTNER, A.; RUSSELL, C. J. Residues in the Heptad Repeat A Region of the Fusion Protein Modulate the Virulence of Sendai Virus in Mice. **J. Virol.**, v. 84, n. 2, p. 810-821, 2010.

MARX, A.; TOROK, T. J.; HOLMAN, R. C.; CLARKE, M. J.; ANDERSON, L. J. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1423-1427, 1997.

MATSUOKA, Y.; CURRAN, J.; PELET, T.; KOLAKOSKY, D.; RAY, R.; COMPANS, R. W. The P gene of human parainfluenza virus type 1 encodes P and C proteins but not a cysteine-rich V protein. **J. Virol.**, v. 65, p. 3406-3410, 1991.

MCINTOSH, K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in the developing world: respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S492-S500, 1991.

MERZ, D. C.; SCHEID, A.; CHOPPIN, P. W. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. **J. Exp. Med.**, v. 151, n. 2, p. 275-88, 1980.

MIRZA, A. M.; DENG, R.; IORIO, M. R. Site-Directed Mutagenesis of a Conserved Hexapeptide in the Paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein: Effects on Antigenic Structure and Function. **J. Virol.**, v. 68, n. 8, p. 5093-5099, 1994.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Viral infections in hospitalized children affected by acute lower respiratory tract disease. **J. Pediatr.**, v. 75, n. 5, p. 334-344, 1999.

MIZUTA, K.; SAITOH, M.; KOBAYASHI, M.; TSUKAGOSHI, H.; AOKI, Y.; IKEDA, T.; ABIKO, C.; KATSUSHIMA, N.; ITAGAKI, T.; NODA, M.; KOZAWA, K.; AHIKO, T.; KIMURA, H. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. **Virol. J.**, v. 13, n. 8, 533, 2011.

MOSCONA, A. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. **Clin. Invest.**, v. 115, n. 7, p. 1688-1698, 2005.

MURPHY, B.; PHELAN, P. D.; JACK, I.; UREN, E. Seasonal pattern in childhood viral lower respiratory tract infections in Melbourne. **Med. J. Aust.**, v. 1, p. 22-24, 1980.

NEWMAN, J. T.; SURMAN, S. R.; RIGGS, J. M.; HANSEN, C. T.; COLLINS, P. T.; MURPHY, B. R.; SKIADOPOULOS, M. H. Sequence analysis of the Washington/1964 Strain of Human Parainfluenza Virus Type 1 (HPIV1) and Recovery and Characterization of

Wild-Type Recombinant HPIV1 Produced by Reverse Genetics. **Virus. Genes**, v. 24, n. 1, p. 77-92, 2002.

NICHOLS, G.W.; COREY, L.; GOOLEY, T.; DAVIS, C.; BOECKH, M. Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. **Blood**, v. 98, n. 3, p. 573-578, 2001.

NICHOLS, W. G.; ERDMAN, D. D.; HAN, A.; ZUKERMAN, C.; COREY, L.; BOECK, M. Prolonged Outbreak of Human Parainfluenza Virus 3 Infection in a Stem Cell Transplant Outpatient Department: Insights from Molecular Epidemiologic Analysis. **Biol. Blood and Marrow Transpl.**, v. 10, p. 58-64, 2004.

NISHIO, M.; TSURUDOME, M.; GARCIN, D. KOMADA, H.; ITO, M.; MERCIER L. E., NOSAKA T., KOLKOFKY, D. Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and mRNA capping. **J. Virol.**, v. 85, n. 2, p. 725-732, 2011.

Ng, D. T.; HIEBERT, S. W.; LAMB, R. A. Different roles of individual N-linked oligosaccharide chains in folding, assembly and transport of the simian virus 5 hemagglutinin-neuraminidase. **Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 5, 1989-2001, 1990.

OHSAWA, K.; YAMADA, A.; TAKEUCHI, K.; WATANABE, Y.; MIYATA, H.; SATO, H. Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, n. 8, p. 919-22, 1998.

PALOMO, C.; GARCIA-BARRENO, B.; PENÑAS, C.; MELERO, J. A. The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 669-675, 1991.

ORTMANN, D.; OHUCHI, M.; ANGLIKER, H.; SHAW, E. Proteolytic cleavage of wild type and mutant of the F protein of Human Parainfluenza Virus type 3 by Subtilisin-like endoproteases, Furin and Kex2. **J. Virol.**, v. 68, n. 4, p. 2772-2776, 1994.

PATERSON, R. G.; SHAUGHNESSY, M. S.; LAMB, R. A. Analysis of the relationship between cleavability of paramyxovirus fusion protein and length of the connecting peptide. **J. Virol.**, v. 63, p. 1293-1301, 1989.

PATTERSON, S.; GROSS, J.; OXFORD, J. S. The intracellular distribution of influenza virus matrix protein and nucleoprotein in infected cells and their relationship to haemagglutinin in the plasma membrane. **J. Gen. Virol.**, v. 69, p. 1859-1872, 1988.

PIRALLA, A.; PERCIVALLE, E.; DI CESARE-MERLONE, A.; LOCATELLI, F.; GERNA, G. Multicenter nosocomial outbreak of parainfluenza virus type 3 infection in a pediatric oncohematology unit: a phylogenetic study. **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 833-839, 2009.

POROTTO, M.; FORNABAIO, M.; GREENGARD, O.; MURRELL, M. T.; KELLOGG, G. E.; MOSCONA, A. Paramyxovirus Receptor-Binding Molecules: Engagement of One Site on the Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Modulates Activity at the Second Site. **J. Virol.**, v. 80, n. 3, p. 1204-1213, 2006.

POROTTO, M.; FORNABAIO, M.; KELLOGG, G. E.; MOSCONA, A. A Second Receptor Binding Site on Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase Contributes to Activation of the Fusion Mechanism. **J. Virol.**, v. 81, p. 3216-3228, 2007.

POROTTO, M.; MURRELL, M.; GREENGARD, O.; DOCTOR, L.; MOSCONA, A. Influence of the Human Parainfluenza Virus 3 Attachment Protein's Neuraminidase Activity on Its Capacity To Activate the Fusion Protein. **J. Virol.**, v. 79, n. 4, p. 2383-2392, 2005.

POROTTO, M.; PALMER, S. G.; PALERMO, L. M.; MOSCONA, A. Mechanism of fusion triggering by Human Parainfluenza Virus Type III: Communication between viral glycoproteins during entry. **J. Biol. Chemistry**, v. 287, p. 778-793, 2012.

POSADA, D.; CRANDDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

RAMBAUT, A.; CHARLESTON, M. Molecular evolution library University of Oxford, 2001. Available from: <<http://evolve.zoo.ox.ac.uk>>. Acesso em: 20 May 2012.

RAY, R.; DUNCAN, J.; QUINN, R.; MATSUOKA, Y. Distinct hemagglutinin and neuraminidase epitopes involved in antigenic variation of recent human parainfluenza virus type 2 isolates. **Virus. Res.**, v. 24, n. 1, p. 107-113, 1992.

RUUSKANEN, O.; LAHTI, E.; JENNINGS, C. L.; MURDOCH, D. R. 2011. Viral pneumonia. **Lancet**, v. 377, p. 1264-1275, 2011.

SATO, M.; WRIGHT, P. F. Current status of vaccines for parainfluenza virus infections. **The Pediatric Infect. Dis. Journal**, v. 27, n. 10, p. S123-S125, 2008.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. 2012. Available from <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/87.html>. Acesso em: 05 Jun 2012.

SHAAP-NUTT, A.; HIGGINS, C.; AMARO-CARAMBOT, E.; NOLAN, S. M.; D'ANGELO, C.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L.; SCHMID, A. C. Identification of Human Parainfluenza Virus type 2 (HPIV-2) V protein amino acid residues that reduce binding of V to MDA5 and attenuate HPIV-2 replication in nonhuman primates. **Virology**, v. 85, n. 5, p. 4007-4019, 2011.

SPRIGGS, M. K.; JOHNSON, P. R.; COLLINS, P. L. Sequence Analysis of the Matrix Protein Gene of Human Parainfluenza Virus Type 3: Extensive Sequence Homology among Paramyxoviruses **J. Gen. Virol.**, v. 68, p. 1491-1497, 1987.

SRINIVASAN, A.; WANG, C.; YANG, J.; SHENEP, J. L.; LEUNG, W. H.; HAYDEN, R. T. Symptomatic Parainfluenza Virus Infections in Children Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 17, n. 10, p. 1520-1527, 2011.

STOREY, D. G.; DIMOCK, K.; KANG, C. Y. Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3. **J. Virol.**, v. 52, n. 3, p. 761-766, 1984.

SWAFFORD, D. L. **Paup*** - phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

TEMPLETON, K. E.; SCHELTINGA, S. A.; BEERSMA, M. F. C.; KROES, A.C. M.; CLAAS, E. C. J. Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 4, p. 1564-1569, 2004.

TERRIER, O.; CARTET, G.; FERRARIS, O.; MORFIN, F.; THOUVENOT, D.; HONG, S. S.; LINA, B. Characterization of naturally occurring parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) variants. **J. Clin. Virol.**, v. 43, p. 86-92, 2008.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L.; SOUSA, T. S.; OLIVEIRA, D. B. L.; GOLONO, M. A.; GILIO, A. E.; STWIEN, K. E.; ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **J. Pediatr.**, v. 83, n. 5, p. 422-8, 2002.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A.; DURIGON, E. L.; TOROK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 125-131, 2001.

Viral Bioinformatic Resource Center, 2010. Available from: <<http://www.vbrc.org/viruses.asp?taxnode=Paramyxoviridae>>. Acesso em: 04 Jun 2012.

WATANABE, M.; MISHIN, V. P.; BROWN, S. A.; RUSSEL, C. J.; BOYD, K.; BABU, Y. S.; TAYLOR, G.; XIONG, S.; YAN, X.; PORTNER, A.; ALYMOVA, I.V. Effect of Hemagglutinin-Neuraminidase Inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 on Growth and Pathogenicity of Sendai/Human Parainfluenza Type 3 Chimera Virus in Mice. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 53, n. 9, p. 3942-3941, 2009.

WATANABE, N.; KAWANO, M.; TSURUDOME, M.; NISHIO, M.; ITO, M.; OHGIMOTO, S.; SUGA, S.; KOMADA, H.; ITO, Y. Binding of the V proteins to the nucleocapsid proteins of human parainfluenza type 2 virus. **Scand. J. Microbiol. Immunol.**, v. 185, p. 89-94, 1996.

WECHSLER, S. L.; LAMBERT, D. M.; GALINSKI, M. S.; HEINEKE, B. E.; PONS, M. W. Human parainfluenza virus 3: purification and characterization of subviral components, viral proteins and viral RNA. **Virus. Res.**, v. 3, p. 339-351, 1985.

WHIMBEY, E. J.; ENGLUND, A.; LJUNGMAN, P. Community respiratory viral infections in the immunocompromised host. Proceedings of a symposium. **Am. J. Med.**, v. 102, p. 1-80, 1997.

YU, X.; LU, R.; WANG, Z.; ZHU, N.; WANG, W.; JULIAN, D.; CHRIS, B.; Lv, J.; TAN, W. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an emergency department in Beijing. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32174, 2012.

ZAMBON, M.; BULL, T.; SADLER, C. J.; GOLDMAN, J. M.; WARD, K. N. Molecular epidemiology of two consecutive outbreaks of parainfluenza 3 in a bone marrow transplant unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 8, p. 2289-2293, 1998.

ZHAN, X.; SLOBOD, K. S.; KRISHNAMURTHY, S.; JOHNSON, L. E. L.; TAKIMOTO, T.; JONES, B.; SURMAN, S.; RUSSELL, C.; PORTNER, A.; HURWITZ, J. L. 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**, v. 26, n. 27-28, p. 3480-3488, 2008.

ZHANG, L.; BUKREYEV, A.; THOMPSON, C. L.; WATSON, B.; PEEPLES, M. E.; COLLINS, P. L.; PICKLES, R. J. Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. **J. Virol.**, v. 79, n. 2 p. 1113-1124, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Pós-Informado

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (menores de 18 anos)

ESTUDO: Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para todos nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao (à) seu (sua) filho(a).

Eu....., RG....., abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a).....nascido (a) em ____/____/____/, seja voluntário (a) do estudo “Diversidade genética dos Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, identificados em amostras colhidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, durante os anos de 1995 a 2005”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente que:

- I. O estudo é necessário para que se possa descobrir as possíveis causas e/ou tratamento, se apropriado, da doença denominada “**doenças respiratórias**”;
- II. Serão feitas coletas de aspirado de nasofaringe e swab nasal do (a) meu (minha) filho (a);
- III. Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho (a); sem provocar danos ou dor;
- IV. A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- V. Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- VI. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que ele (ela) estiver sendo submetido;
- VII. Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o do meu filho sejam mencionados;
- VIII. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;
- IX. Poderei contatar a Secretariada Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB-USP, no fone 30917733 ou 30917200 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

OBS: Assinalar abaixo com x

() Desejo conhecer os resultados da pesquisa

() Não desejo conhecer os resultados da pesquisa

São Paulo, _____ de _____ de _____

() Paciente / () Responsável.....

Testemunha 1: _____

Nome/RG/Telefone

Testemunha 2:

Nome/RG/Telefone

Responsável pelo Projeto; _____

Dr (a) Responsável

ANEXO B – Representação esquemática dos testes realizados para a padronização da RT-multiplex PCR e da PCR para amplificação parcial do gene da HN.

	MgCl ₂ (mM)	primers (pmol)	dNTP (mM)	Enzima (U)	n. ciclos	Amostra (μL)
1	1	10	0.1	1	35	1
2	1	10	0.1	1	35	2.5
3	1	10	0.1	1	35	5
4	2	10	0.1	1	35	1
5	2	10	0.1	1	35	2.5
6	2	10	0.1	1	35	5
7	3	10	0.1	1	35	1
8	3	10	0.1	1	35	2.5
9	3	10	0.1	1	35	5
10	2	5	0.1	1	35	1
11	2	5	0.1	1	35	2.5
12	2	5	0.1	1	35	5
13	2	10	0.1	1	35	1
14	2	10	0.1	1	35	2.5
15	2	10	0.1	1	35	5
16	2	15	0.1	1	35	1
17	2	15	0.1	1	35	2.5
18	2	15	0.1	1	35	5
19	2	5	0.1	1	35	1
20	2	5	0.1	1	35	2.5
21	2	5	0.1	1	35	5
22	2	10	0.2	1	35	1
23	2	10	0.2	1	35	2.5
24	2	10	0.2	1	35	5
25	2	15	0.3	1	35	1
26	2	15	0.3	1	35	2.5
27	2	15	0.3	1	35	5
28	2	5	0.2	1	35	1
29	2	5	0.2	1	35	2.5
30	2	5	0.2	1	35	5
31	2	10	0.2	1.5	35	1
32	2	10	0.2	1.5	35	2.5
33	2	10	0.2	1.5	35	5
34	2	15	0.2	2	35	1
35	2	15	0.2	2	35	2.5
36	2	15	0.2	2	35	5
37	2	5	0.2	1	30	1
38	2	5	0.2	1	30	2.5
39	2	5	0.2	1	30	5
40	2	10	0.2	1.5	35	1
41	2	10	0.2	1.5	35	2.5
42	2	10	0.2	1.5	35	5
43	2	15	0.2	2	40	1
44	2	15	0.2	2	40	2.5
45	2	15	0.2	2	40	5

ANEXO C - Testes de alteração de volume de amostra

	MgCl ₂ (mM)	primers (pmol)	dNTP (mM)	Enzima (U)	n. ciclos	Amostra (μL)
1	2	10	0.2	1	40	1
2	2	10	0.2	1	40	2.5
3	2	10	0.2	1	40	5
4	2	10	0.2	1	40	7.5
5	2	10	0.2	1	40	8
6	2	10	0.2	1	40	9
7	2	10	0.2	1	40	10

ANEXO D - Descrição das reações de Semi-nested PCR, realizadas com controles positivos e com as amostras que não amplificaram

Testes	Amostra	dNTP (mM)	Taq	Magnésio	Annelling	N. ciclos	Primer (+)	Primer(-)
1	1µL	0,1	1 µL	2mM	52°C	35	10pMol (PIP)	10pMol (PIS)
2	2,5µL	0,1	1 µL	2mM	52°C	35	10pMol (PIP)	10pMol (PIS)
3	5,0µL	0,1	1 µL	2mM	52°C	35	10pMol (PIP)	10pMol (PIS)
4	1µL	0,1	1 µL	2mM	52°C	35	10pMol (PIS)	10 pMol (PIP)
5	2,5µL	0,1	1 µL	2mM	52°C	35	10pMol (PIS)	10 pMol (PIP)
6	5,0µL	0,1	1 µL	2mM	52°C	35	10pMol (PIS)	10 pMol (PIP)

ANEXO E - Painei geral das amostras positivas para HPIV1, 2 e, 3. Número da amostra, resultado da triagem, resultado da amplificação parcial do gene HN e sequenciamento, idade da criança e mês da coleta

Amostra	Idade	mês de coleta	Resultado da Tipagem	Amplificação fragmento de 500pb
1995-28	12 meses	abr	PIVI-1	NA
1995-29	11 meses	abr	PIVI-3	NA
1995-30	6 anos	abr	PIVI-3	NA
1995-32	4 meses	abr	PIVI-3	NA
1995-62	12 meses	mai	PIVI-3	OK
1995-64	8 meses	mai	PIVI-3	OK
1995-66	9 anos	mai	PIVI-3	NA
1995-76	1 mês	jun	PIVI-2	NA
1995-105	12 meses	jul	PIVI-3	OK
1995-136	12 meses	ago	PIVI-1	OK
1995-157	2 meses	set	PIVI-3	NA
1995-163	6 meses	out	PIVI-3	NA
1995-164	4 meses	out	PIVI-3	OK
1995-165	12 meses	out	PIVI-3	NA
1995-167	12 meses	out	PIVI-3	NA
1995-174	7 meses	nov	PIVI-1	NA
1995-180	7 meses	dez	PIVI-2	NA
1995-189	ND	ND	PIVI-3	NA
1995-196	ND	ND	PIVI-3	NA
1996-61	ND	abr	PIVI-3	NA
1998-38	3 meses	mai	PIVI-3	VI
1998-51	6 meses	mai	PIVI-3	NA
1998-65	3 meses	jun	PIVI-3	NA
1998-88	7 meses	jul	PIVI-3	NA
1998-90	5 meses	jul	PIVI-1	NA
1998-99	7 meses	jul	PIVI-3	NA
1998-102	7 meses	jul	PIVI-3	NA
1998-104	ND	out	PIVI-3	NA
1999-5	2 meses	abr	PIVI-3	NA
1999-6	5 meses	abr	PIVI-1	VI
1999-13	2 meses	abr	PIVI-3	NA
1999-15	2 meses	mai	PIVI-3	NA
1999-29	7 meses	mai	PIVI-3	NA
1999-38	1 mês	jun	PIVI-3	NA
1999-62	20 dias	jun	PIVI-3	NA
1999-88	12 meses	jun	PIVI-3	VI
1999-96	15 dias	jul	PIVI-3	NA
1999-99	6 meses	jul	PIVI-3	VI
1999-101	5 meses	jul	PIVI-3	OK
1999-104	2 meses	jul	PIVI-3	NA
1999-107	2 meses	jul	PIVI-1	VI
1999-119	9 meses	ago	PIVI-1	VI
1999-128	7 meses	set	PIVI-3	NA

Amostra	Idade	mês de coleta	Resultado da Tipagem	Amplificação fragmento de 500pb
1999-140	8 meses	set	PIVI-3	VI
1999-141	4 meses	set	PIVI-3	NA
1999-143	11 meses	set	PIVI-3	OK
1999-144	11 meses	out	PIVI-3	OK
1999-149	2 meses	out	PIVI-3	OK
1999-151	5 meses	out	PIVI-3	OK
1999-152	6 meses	out	PIVI-3	NA
1999-153	6 meses	out	PIVI-3	OK
1999-154	5 meses	out	PIVI-3	OK
1999-155	3 meses	nov	PIVI-3	VI
1999-159	ND	dez	PIVI-3	NA
1999-161	ND	ND	PIVI-2	VI
1999-165	5 meses	ND	PIVI-1	NA
2000-4	10 meses	jan	PIVI-3	OK
2000-9	4 meses	fev	PIVI-3	OK
2000-59	1 mês	mai	PIVI-2	OK
2000-105	ND	jun	PIVI-3	NA
2000-185	ND	jul	PIVI-3	OK
2000-186	ND	jul	PIVI-3	OK
2000-187	ND	ago	PIVI-3	OK
2000-188	ND	ago	PIVI-3	OK
2000-197	ND	ago	PIVI-3	NA
2000-198	ND	ago	PIVI-3	OK
2001-13	12 meses	abr	PIVI-1	OK
2001-35	3 meses	mai	PIVI-1	NA
2001-65	22 dias	set	PIVI-3	NA
2001-78	4 meses	out	PIVI-3	NA
2001-88	4 meses	out	PIVI-3	NA
2002-79	ND	abr	PIVI-3	VI
2002-106	ND	jun	PIVI-3	NA
2002-110	ND	jun	PIVI-3	NA
2002-133	ND	jul	PIVI-3	VI
2002-145	ND	ago	PIVI-3	VI
2002-153	ND	set	PIVI-1	OK
2002-154	ND	set	PIVI-3	OK
2002-163	ND	out	PIVI-3	OK
2002-166	ND	nov	PIVI-3	VI
2002-173	ND	dez	PIVI-3	OK
2003-198	2 anos	jun	PIVI-3	NA
2003-217	12 meses	jun	PIVI-3	OK
2003-225	2 meses	jun	PIVI-3	OK
2003-289	3 meses	jun	PIVI-3	OK
2003-304	8 meses	ago	PIVI-3	VI
2003-309	12 meses	ago	PIVI-3	NA
2003-310	2 meses	ago	PIVI-3	NA
2003-331	12 meses	set	PIVI-3	OK

Amostra	Idade	Mês da coleta	Tipagem	Amplificação fragmento de 500 pb
2003-337	2 meses	set	PIVI-3	OK
2003-338	0 dias	set	PIVI-3	OK
2003-339	8 meses	set	PIVI-3	OK
2003-340	12 meses	set	PIVI-3	OK
2003-341	7 meses	set	PIVI-3	OK
2003-342	4 meses	set	PIVI-3	OK
2003-343	6 meses	set	PIVI-3	OK
2003-344	6 meses	set	PIVI-3	OK
2003-345	2 meses	set	PIVI-3	OK
2003-355	6 meses	set	PIVI-3	OK
2004-32	12 meses	jan	PIVI-3	NA
2004-67	1ano 5meses	fev	PIVI-2	VI
2004-152	2 anos 11meses	mar	PIVI-3	VI
2004-214	3 meses	mar	PIVI-3	VI
2004-230	10 meses	mar	PIVI-2	VI
2004-242	ND	mar	PIVI-3	NA
2004-291	5 meses	mar	PIVI-1	NA
2004-324	5 meses	mar	PIVI-3	NA
2004-345	9 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-349	10 meses	abr	PIVI-3	OK
2004-360	ND	abr	PIVI-1	VI
2004-362	10 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-365	2 meses	abr	PIVI-1	VI
2004-376	1 ano 2 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-380	5 meses	abr	PIVI-1	VI
2004-403	11 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-423	3 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-429	6 meses	abr	PIVI-3	NA
2004-431	7 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-432	2 meses	abr	PIVI-3	VI
2004-441	7 meses	abr	PIVI-1	VI
2004-442	ND	abr	PIVI-3	VI
2004-445	7 meses	abr	PIVI-3	NA
2004-476	ND	abr	PIVI-3	VI
2005-19	12 meses	jan	PIVI-2	VI
2005-35	27 dias	fev	PIVI-3	VI
2005-38	26 dias	fev	PIVI-3	VI
2005-112	10 meses	mar	PIVI-3	VI
2005-113	5 meses	mar	PIVI-3	VI
2005-173	8 meses	mai	PIVI-1	NA
2005-207	10 meses	abr	PIVI-3	OK
2005-330	12 meses	abr	PIVI-3	NA
2005-336	1 mês	jul	PIVI-3	OK
2005-368	12 meses	abr	PIVI-3	VI
2005-433	12 meses	abr	PIVI-3	NA

Amostra	Idade	Mês da coleta	Tipagem	Amplificação fragmento de 500 pb
2005-480	ND	ND	PIVI-3	VI

VI - volume insuficiente da amostra original para a amplificação; NA – Amostra positiva para um dos HPIVs na triagem cujo gene da HN não foi amplificado; OK – Amostra positiva na triagem cujo gene da HN foi amplificado e sequenciado.

Fonte: Perini (2012).

ANEXO F: sequências do Genbank utilizadas na análise filogenética

HPIV-1		
Número acesso GenBank	Local - Ano	amostra
X55803.1	ND	P11
AF039938.1	Nevada, 1985	-
AF039935.1	Oregon, 1974	-
AF039928.1	Boston, 1985	-
AF039923.1	Córdoba, 1967	-
AB569589.1	Yokohama, 2008	-
AB565747.1	Yokohama, 2008	-
AB641223.1	Yamagata, 2005	2702
AB641184.1	Yamagata, 2005	1494
AB641222.1	Yamagata, 2005	2658
AB641221.1	Yamagata, 2005	2637
AB641220.1	Yamagata, 2005	2624
AB641219.1	Yamagata, 2005	2570
AB641218.1	Yamagata, 2005	2557
AB641217.1	Yamagata, 2005	2405
AB641216.1	Yamagata, 2005	2395
AB641215.1	Yamagata, 2005	2252
AB641213.1	Yamagata, 2005	2225
AB641212.1	Yamagata, 2005	2144
AB641211.1	Yamagata, 2005	2139
AB641210.1	Yamagata, 2005	2107
AB641209.1	Yamagata, 2005	2105
AB641208.1	Yamagata, 2005	1932
AB641207.1	Yamagata, 2005	1902
AB641206.1	Yamagata, 2005	1886
AB641205.1	Yamagata, 2005	1863
AB641204.1	Yamagata, 2005	1849
AB641203.1	Yamagata, 2005	1835
AB641202.1	Yamagata, 2005	1789
AB641201.1	Yamagata, 2005	1774
AB641199.1	Yamagata, 2005	1771
AB641198.1	Yamagata, 2005	1694
AB641197.1	Yamagata, 2005	1686
AB641196.1	Yamagata, 2005	1684
AB641195.1	Yamagata, 2005	1670
AB641194.1	Yamagata, 2005	1641
AB641193.1	Yamagata, 2005	1630

Número acesso GenBank	Local - Ano	amostra
AB641192.1	Yamagata,2005	1569
AB641191.1	Yamagata,2005	1543
AB641190.1	Yamagata,2005	1535
AB641189.1	Yamagata,2005	1513
AB641188.1	Yamagata,2005	1504
AB641187.1	Yamagata,2005	1501
AB641186.1	Yamagata,2005	1499
AB641183.1	Yamagata,2005	1472
AB641182.1	Yamagata,2005	1465
AB641181.1	Yamagata,2005	1388
AB641180.1	Yamagata,2005	1357
AB641179.1	Yamagata,2005	1356
AB641178.1	Yamagata,2005	1346
AB641177.1	Yamagata,2005	1343
AB641176.1	Yamagata,2005	1335
AB641175.1	Yamagata,2005	1328
AB641174.1	Yamagata,2005	1324
AB641173.1	Yamagata,2005	1265
AB641172.1	Yamagata,2005	1258
AB641171.1	Yamagata,2005	1229
AB641170.1	Yamagata,2005	1228
AB641168.1	Yamagata,2005	1217
AB641167.1	Yamagata,2005	1175
AB641166.1	Yamagata,2005	1173
AB641165.1	Yamagata,2005	1164
AB641164.1	Yamagata,2005	1153
AB641134.1	Yamagata,2005	1122
AB641133.1	Yamagata,2005	1565
AB641132.1	Yamagata,2005	1433
U70946.1	Milwaukee, 1991	Mil 62/91
U70945.1	Milwaukee, 1991	Mil 61/91
U70943.1	Milwaukee, 1991	Mil 58/91
U70937.1	Milwaukee, 1991	Mil 49/91
AB542810.1	ND	C35
U01085.1	Houston 1989	HT89c
U01084.1	Houston 1989	HT89b
U01082.1	Houston 1988	HT88
U01081.1	Houston 1987	HT87
U01080.1	Houston 1985	HT85b
U01079.1	Houston 1985	HT85a
U01078.1	Houston 1983	HT83b

Número acesso GenBank	Local - Ano	amostra
U01077.1	Houston 1983	HT83a
U01076.1	Houston 1982	HT82b
U01075.1	Houston 1982	HT82a
U01074.1	Houston 1981	HT81b
U01073.1	Houston 1981	HT81a
AF016280.1	Washington, 1964	Washington 20993
U70948.1	Milwaukee, 1991	Mil 64/91
U70942.1	Milwaukee, 1991	Mil 55/91
U70940.1	Milwaukee, 1991	Mil 53/91
U70936.1	Milwaukee, 1991	Mil 48/91
U70944.1	Milwaukee, 1991	Mil 60/91
U70947.1	Milwaukee, 1991	Mil 63/91
U70941.1	Milwaukee, 1991	Mil 54/91
U70939.1	Milwaukee, 1991	Mil 52/91
AF457102.1	Washington, 1964	Walsh, 1964
HPIV-2		
DQ072589.1	Lyon, 1997	Lyon/26056/1997
DQ072588.1	Lyon, 1991	20435/Lyon/2001
DQ072587.1	Lyon, 2001	Lyon/20283/2001
DQ072586.1	Lyon, 2001	LYON/18620/2001
19525721:6639-8742	ND	TOSHIBA
AB367954.1	ND	GREER-J1
AB189952.1	Japão, ND	TC-6482
AB189953.1	Japão, ND	TC-6558
AB189950.1	Japão, ND	76-86
AB189949.1	Japão, ND	86-391
AB189948.1	Japão, ND	62-M786
61985:6639-8742	ND	ND
67906100:6821-8536	ND	TOSHIBA
AF213352.1	ND	V9412-6
AF039937	California, 1980	-
AF039934.1	Kansas, 1982	-
AF039932.1	Hawaii, 1968	-
AF039931.1	Delaware, 1971	-
AF039930.1	Connecticut, 1977	-
D00865.1	Londres, ND	-
HPIV-3		
AF039922.1	Alabama, 1979	-
AF039936.1	Oregon, 1981	-
AF039933.1	Idaho, 1977	-
AF039927.1	Massachusetts, 1995	-

Número acesso GenBank	Local - Ano	amostra
AF039926.1	Massachusetts, 1995	-
AF039925.1	Massachusetts, 1995	-
AF039924.1	Massachusetts, 1995	-
FJ455842.2	China, 2003	LZ22
M20402.1	ND	-
M21649.1	ND	-
M18760.1	Austrália, 1974	AUS/124854/74
M17641.1	ND	47885
AF039929.1	Manitoba, 1981	-
AB189961.1	Japão	HA-1
EU326526.1	China	ZHYMgz01
AJ315908.1	Reino Unido, 1995	MK9
NC_001796.2	ND	Clone 92
AB189960.1	ND	-
AY283063.1	ND	-
EU424062.1	ND	14702

ANEXO G: Sequências contidas na análise filogenética de HPIV-1

Sequências presente na árvore	Sequências idênticas não apresentadas na árvore
Yamagata 2002 1433	Yamagata 2002 1565
Yamagata 2005 1494	Yamagata 2005 1153
	Yamagata 2005 1164
	Yamagata 2005 1173
	Yamagata 2005 1175
	Yamagata 2005 1229
	Yamagata 2005 1258
	Yamagata 2005 1335
	Yamagata 2005 1343
	Yamagata 2005 1346
	Yamagata 2005 1543
	Yamagata 2005 1684
	Yamagata 2005 1686
	Yamagata 2005 1789
	Yamagata 2005 2139
	Yamagata 2005 2144
	Yamagata 2005 2225
	Yamagata 2005 2252
	Yamagata 2005 2395
	Yamagata 2005 2405
	Yamagata 2005 2658
Yamagata 2005 1902	Yamagata 2005 2570
	Yamagata 2005 2105
	Yamagata 2005 1932
	Yamagata 2005 1886
	Yamagata 2005 1513
	Yamagata 2005 1501
	Yamagata 2005 1357
	Yamagata 2005 1356
Yamagata 2005 1849	Yamagata 2005 1769
	Yamagata 2005 1641
	Yamagata 2005 1535
	Yamagata 2005 1472
	Yamagata 2005 1324
	Yamagata 2005 1217
Yamagata 2005 1388	Yamagata 2005 2702
	Yamagata 2005 2637
	Yamagata 2005 2557
	Yamagata 2005 1863
	Yamagata 2005 1835
	Yamagata 2005 1694

Sequências presente na árvore	Sequências idênticas não apresentadas na árvore
	Yamagata 2005 1630
	Yamagata 2005 1504
	Yamagata 2005 1465
	Yamagata 2005 1265
	Yamagata 2005 1213
	Yamagata 2005 1228
	Yamagata 2005 1328
	Yamagata 2005 1499
	Yamagata 2005 1569
	Yamagata 2005 1670
	Yamagata 2005 1771
Houston HT89a	Houston HT 88
Houston HT 83a	Houston HT 82b
Houston HT 82	Houston HT 81a

A primeira coluna indica todas as sequências mostradas na topologia da árvore de HPIV-1 (Figura 20). Segunda coluna apresenta as sequências analisadas e que se mostraram idênticas as da primeira coluna, não sendo especificadas na topologia da árvore.

Fonte: Perini, 2012.

ANEXO H: Sequências contidas na análise filogenética de HPIV-2

Sequências presente na árvore	Sequências idênticas não apresentadas na árvore
gi 67906100 6821 - 8536	Gi 19525721 6639-8742

A primeira coluna indica todas as sequências mostradas na topologia da árvore de HPIV-2 (Figura 21). Segunda coluna apresenta as sequências analisadas e que se mostraram idênticas as da primeira coluna, não sendo especificadas na topologia da árvore.

Fonte: Perini, 2012.

ANEXO I: Sequências contidas na análise filogenética de HPIV-3

Sequências presente na árvore	Sequências idênticas não apresentadas na árvore
Br_2000_186	Br_2000_188
Br_2002_154	Br_2003_355
	Br_2002_163
Br_1995_62	Br_1995_164
M21649.1	M17641.1

A primeira coluna indica todas as sequências mostradas na topologia da árvore de HPIV-3 (Figura 22). Segunda coluna apresenta as sequências analisadas e que se mostraram idênticas as da primeira coluna, não sendo especificadas na topologia da árvore.

Fonte: Perini, 2012.