

**UIRAJAN JOSÉ DA SILVA**

**Avaliação de mutações na proteína F do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) com potencial resistência nos epítomos de Ligação do Palivizumabe (PZV) em crianças sem uso do PZV.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2018

**UIRAJAN JOSÉ DA SILVA**

**Evaluation of mutations in Respiratory Syncytial Virus (HRSV) F Protein with potential resistance in the binding epitopes of Palivizumab (PZV) in children without PZV.**

Dissertation presented to the Microbiology Department of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo, to obtain the Degree of Master in Sciences.

São Paulo  
2018

**UIRAJAN JOSÉ DA SILVA**

**Avaliação de mutações na proteína F do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) com potencial resistência nos epítomos de ligação do Palivizumabe (PZV) em Crianças sem Uso do PZV.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Edison Luiz Durigon

Versão Corrigida.

São Paulo

2018

**UIRAJAN JOSÉ DA SILVA**

**Evaluation of mutations in Respiratory Syncytial Virus (HRSV) F Protein with potential resistance in the binding epitopes of Palivizumab (PZV) in children without PZV.**

Dissertation presented to the Microbiology Department of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo, to obtain the Degree of Master in Sciences.

Concentration area: Microbiology

Advisor: Edison Luiz Durigon

Corrected version.

São Paulo

2018

## CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo Ficha Catalográfica elaborada pelo autor.

da Silva, Uirajan José

Avaliação de Mutações na Proteína F do Vírus Respiratório Sincicial (HRSV) com Potencial Resistência nos Epítomos de Ligação do

Palivizumabe (PZV) em Crianças sem Uso do PZV / Uirajan José da Silva; orientador Edison Luiz Durigon. – São Paulo, 2018.

106 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glicoproteína F. 2. MARM. 3. HRSV. 4. Palivizumabe. I. Durigon, Edison Luiz, orientador.

II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato: Uirajan José da Silva

Título da Dissertação: **Avaliação de Mutações na Proteína F do Vírus Respiratório Sincicial (HRSV) com Potencial Resistência nos Epítomos de Ligação do Palivizumabe (PZV) em Crianças sem Uso do PZV.**

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de Mutações na Proteína F do Vírus Respiratório Sincicial (HRSV) com Potencial Resistência nos Epítomos de Ligação do Palivizumabe (PZV) em Crianças sem Uso do PZV.

**Pesquisador:** UIRAJAN JOSE DA SILVA

**Área Temática:** Genética Humana:

Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP)

Versão: 1

**CAAE:** 82576917.5.0000.5467

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.519.108

#### **Apresentação do Projeto:**

O projeto está bem apresentado. O objetivo é claro e baseado em hipótese viável. O projeto está apoiado por literatura especializada e pertinente. Utilizarão amostras de biorrepositório, por isso solicita-se dispensa do TCLE, que se justifica, no caso. Os métodos propostos para atingir os objetivos são adequados e de domínio do grupo proponente. O planejamento experimental é adequado.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo do projeto é fazer o monitoramento genotípico do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) estudando as mudanças evolutivas na proteína F, porção parcial F1 (aminoácido 262 a 276), do HRSV particularmente mutações de potencial resistência nos epítomos de ligação do palivizumabe, de cepas oriundas de crianças atendidos no Departamento de Pediatria e Puericultura da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com as sequências padrão, disponíveis no site do NCBI.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Como serão utilizadas amostras já colhidas e que se encontram armazenadas em biorrepositório, não há risco.

**Benefícios:** O projeto poderá contribuir para o conhecimento clínico do patógeno Vírus a Respiratório Sincicial Humano, visando aprimorar as respostas médicas à infecção causada pelo mesmo.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa sobre o vírus respiratório sincicial (HRSV), como a proposta ora em análise, é relevante e importante pois infecções por esse vírus constituem a principal causa de infecções respiratórias agudas e uma das causas de internação e morte entre crianças menores de 5 anos de idade em todo o mundo. O Palivizumabe (PZV), um anticorpo IgG monoclonal humanizado, é a única profilaxia aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) contra infecção por HRSV. Trabalhos prévios demonstraram que mutações nos aminoácidos S268I, K272Q, K272E, S275L e N276S da proteína F do HRSV, que conferem resistência ao PZV, já existem na população e podem propiciar recidivas em pacientes. Os pesquisadores propõem-se a fazer estes monitoramentos genotípicos do HRSV estudando as mudanças evolutivas na proteína F, porção parcial F1 (262 a 276 Aá), do HRSV particularmente mutações de potencial resistência nos epítomos de ligação do palivizumabe de cepas oriundas de crianças que não fizeram uso do PZV. Como etapa final desse estudo, pretendem analisar a variabilidade do HRSV a fim de explorar as características filogenéticas e filodinâmicas dos diferentes genótipos, comparando as seqüências das amostras coletadas no hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com as sequências padrão, disponíveis no site do NCBI. A pesquisa pode contribuir para aprofundar o conhecimento Clínico deste patógeno visando aprimorar as respostas médicas à infecção causada pelo mesmo.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Há pedido de dispensa do TCLE pois o projeto de pesquisa utilizará amostras já coletadas e depositadas em biorrepositório do professor Edison Luiz Durigon. Portanto plenamente justificado o pedido de dispensa do TCLE. Encontra-se anexa autorização para utilização do biorrepositório pelo responsável do mesmo. Ainda se encontram anexos documento comprovando a aprovação do projeto pela Comissão de Pesquisa da Santa Casa e o

TCLE (apesar de dispensável no caso).

**Recomendações:**

Recomenda-se a aprovação do projeto

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclui-se pela aprovação do projeto. Não há pendências ou inadequações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado do CEP-ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação `as amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO PROJETO_1041287.pdf	09/01/2018 14:25:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	EticaSantaCasa.pdf	09/01/2018 14:20:02	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/01/2018 14:17:09	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORE.pdf	08/12/2017 18:27:03	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado Brochura Investigador	projeto.docx	08/12/2017 11:10:30	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	08/12/2017 11:07:52	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito
Brochura Pesquisa	brochura.docx	08/12/2017 10:55:23	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	08/12/2017 10:53:28	UIRAJAN JOSE DA SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Avaliação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 28 de Fevereiro de 2018

---

Assinado por:  
**Camila Squarzoni Dale (Coordenador)**



## **DEDICATÓRIA**

Primeiramente gostaria de dedicar este trabalho ao meu orientador Professor Dr. Edison Luiz Durigon, que mesmo com minhas dificuldades e limitações guiou-me até a conclusão deste trabalho. Dedico o mesmo também a todo o grupo do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, especialmente a Doutora Danielle Bruna Leal de Oliveira e ao Doutor Luciano Matsumiya Thomazelli pelo suporte e fornecimento dos dados arquivados das amostras da Santa Casa de Misericórdia.

Como também não poderia deixar de dedica-lo aos responsáveis pelo estudo denominado "Vírus Respiratórios: Características clínicas, epidemiológicas e moleculares em crianças com infecção respiratória aguda" realizado no departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, os quais tornaram possível a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Tenho muito a agradecer primeiramente ao meu Orientador Professor Doutor Edison Luiz Durigon pela oportunidade de atuar com uma equipe a qual tenho muito orgulho de participar. Agradeço também á esta equipe do LVCM pelo suporte prestado em todas as etapas deste trabalho.

Pelo crucial papel de ter fornecido os dados iniciais das amostras da Santa Casa que estavam arquivados no ICB, agradeço a toda á equipe responsável pelo estudo denominado “Vírus Respiratórios: Características clínicas, epidemiológicas e moleculares em crianças com infecção respiratória aguda” realizado no departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, os quais tornaram possível a realização deste trabalho.

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

Por fim gostaria de agradecer imensamente aos meus colegas Marielton dos Passos Cunha e Shahab Zaki Pour pelas dúvidas esclarecidas e sugestões que me auxiliaram durante as análises deste trabalho.

## Resumo

DA SILVA, UJ. Avaliação de Mutações na Proteína F do Vírus Respiratório Sincicial (HRSV) com Potencial Resistência nos Epítomos de Ligação do Palivizumabe (PZV) em Crianças sem Uso do PZV.2018.107 f. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) é uma das principais causas de mortes entre crianças e lactentes hospitalizadas com infecção respiratória aguda no mundo. O HRSV é um vírus (-) ssRNA não-segmentado pertencente à família Pneumoviridae e ao gênero Orthopneumovirus, sendo primeiramente descrito em 1956 no Instituto Walter Reed Army nos EUA.

O presente estudo foi conduzido em amostras de aspirado nasofaríngeo coletadas de crianças de até 2 anos de idade internadas no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e traz uma análise retrospectiva evolutiva da proteína de Fusão do HRSV, enfatizando a região do sítio de atuação do palivizumabe que é atualmente o único agente profilático disponível para a infecção ocasionada por este vírus. Mutações dentro do sítio A já foram descritas como responsáveis pelo surgimento de estirpes resistentes ao palivizumabe, então estudos no monitoramento do surgimento de possíveis mutantes de escape para este mAB, bem como o padrão de distribuição desta mutação entre as populações virais é de extrema importância. Desta forma foram realizadas análises da frequência de mutações da proteína F no Banco de dados do NCBI a qual mostrou a crescente distribuição da mutação N276S (que foi uma mutação primeiramente descrita em 2010) ao longo dos anos nas sequências do *GenBank*. A mutação possivelmente foi fixada no subtipo A, e, embora também ocorra a mutação na mesma posição para o subtipo B (S276N), esta última ocorre com uma frequência extremamente baixa. A genotipagem evidenciou uma co-circulação entre os dois subtipos de HRSV nas 3 estações sazonais. No ano de 2008 o subtipo A prevaleceu, enquanto que no ano de 2009 (ano em que foi inserida a mutação N276S no genótipo NA1) o subtipo B prevaleceu. No ano de 2010 observou-se um maior equilíbrio na presença dos subtipos e a mutação permanece no genótipo NA1 no último ano estudado. Dentre os subtipos foram identificados 3 genótipos para HRSVA, GA2, GA5, NA1, e 3 genótipos para HRSVB, BA9, BA10, GB13. Dentro do sítio II a média de similaridade entre as sequências foi de 96% ao nível nucleotídico e 100 % ao nível de aminoácido, demonstrando o alto padrão de conservação na região

de atuação do palivizumabe sendo que foram detectados 33 sítios polimórficos neutros e 3 não-neutros entre os dois subtipos, sem a presença de indels.

As predições de pressão seletiva realizadas nas sequências da Santa casa mostraram sítios com possíveis eventos de seleção purificadora em HRSVA e HRSVB. A análise não mostrou evento de seleção dentro da região de atuação do palivizumabe para os dois subtipos. A taxa dN/dS para o subtipo A foi de 0.0305 e para o subtipo B foi de 0.0558, ou seja, ambas as ferramentas predizeram eventos de pressão seletiva negativa nos dois subtipos.

A predição dos possíveis efeitos funcionais das mutações no sítio A e aminoácidos vizinhos, mostrou que existem regiões na qual alterações de aminoácidos teriam efeito neutro, como nos sítios 254-256. Apresentando efeitos razoavelmente toleráveis podem-se destacar os sítios 259,267,270 e 275. Já entre os sítios no qual mutações teriam os maiores efeitos na função proteica pode-se destacar o sítio 263. As predições para analisar os possíveis efeitos estruturais retornaram em sua maioria valores pouco consideráveis, com relação à mutações que resultariam em aumento da estabilidade proteica. Com relação a um possível aumento da estabilidade da proteína de fusão do HRSV do subtipo A, vale destacar a mutação S275L com um valor de  $\Delta\Delta G$  bastante considerável. Por outro lado, esta predição mostrou que as mutações dentro do sítio A podem ocasionar muitas reduções consideráveis na estabilidade proteica, como nas mutações I226M/V e K272T. Para a proteína de fusão do subtipo B, além da mutação S275L que ocasiona um aumento da estabilidade proteica, encontramos opostamente a isso a mutação L273F que reduz consideravelmente a estabilidade da mesma. As mutações na posição 276 não demonstraram influenciar estruturalmente a proteína F.

No presente estudo podemos verificar pela primeira vez no Brasil a introdução da mutação N276S na população de HRSV do subtipo A nas amostras da Santa Casa de Misericórdia no ano de 2009 e sua manutenção no ano seguinte.

**Palavras-Chave:** *Glicoproteína F. MARM. HRSV. Palivizumabe*

## Abstract

DA SILVA, UJ. Evaluation of mutations in Respiratory Syncytial Virus (HRSV) F protein with potential resistance in the binding epitopes of Palivizumab (PZV) in children without PZV. 2018.107 f. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is a leading cause of death among children and hospitalized infants with acute respiratory infection worldwide. HRSV is a non-segmented (-) ssRNA virus belonging to the Pneumoviridae family and to the genus Orthopneumovirus, being first described in 1956 at the Walter Reed Army Institute in the USA.

The present study was conducted on nasopharyngeal aspirate samples collected from children up to 2 years of age hospitalized at the Santa Casa de Misericórdia Hospital in São Paulo and brings a retrospective evolutionary analysis of the HRSV fusion protein, emphasizing the region of the site of action of palivizumab which is currently the only prophylactic agent available for the infection caused by this virus. Mutations within site A have already been described as responsible for the emergence of resistant strains of palivizumab, so studies on monitoring the emergence of possible escape mutants for this mAB, as well as the pattern of distribution of this mutation among viral populations is of paramount importance. In this way analyzes of the frequency of F protein mutations were performed in the NCBI database, which showed the increasing distribution of the N276S mutation (which was a mutation first described in 2010) over the years in the *GenBank* sequences. The mutation was possibly fixed in subtype A, and although the mutation also occurs in the same position for subtype B (S276N), the latter occurs at an extremely low frequency. Genotyping revealed a co-circulation between the two subtypes of HRSV in the 3 seasonal seasons. In 2008, subtype A prevailed, whereas in 2009 (year in which the N276S mutation was inserted in the NA1 genotype), subtype B prevailed. In the year 2010 a greater balance was observed in the presence of subtypes and the mutation remains in the genotype NA1 in the last year studied. Among the subtypes, 3 genotypes were identified for HRSVA, GA2, GA5, NA1, and 3 genotypes for HRSVB, BA9, BA10, GB13. Within site II, the average similarity between the sequences was 96% at the nucleotide level and 100% at the amino acid level, demonstrating the high conservation status in the palivizumab region of activity, with 33 neutral polymorphic sites and 3 non- between the two subtypes, without the presence of indels.

The selective pressure predictions performed in the Santa house sequences showed sites with possible purifying selection events in HRSVA and HRSVB. The analysis did not show selection event within the palivizumab region of action for the two subtypes. The dN / dS rate for subtype A was 0.0305 and for subtype B it was 0.0558, that is, both tools predicted negative selective pressure events in the two subtypes. The prediction of possible functional effects of mutations at site A and neighboring amino acids showed that there are regions in which amino acid changes would have a neutral effect, such as at sites 254-256. Feasible effects can be highlighted at sites 259, 267, 270 and 275. Already among the sites in which mutations would have the greatest effects on protein function can be highlighted the site 263.

The predictions to analyze the possible structural effects returned mostly values little mutations that would result in increased protein stability. With respect to a possible increase in the stability of the HRSV fusion protein of subtype A, it is worth mentioning the S275L mutation with a very considerable  $\Delta\Delta G$  value. On the other hand, this prediction has shown that mutations within the A site can cause many considerable reductions in protein stability, as in I226M / V and K272T mutations. For the fusion protein of subtype B, in addition to the S275L mutation that causes an increase in protein stability, we find the L273F mutation that considerably reduces its stability. Mutations at position 276 did not demonstrate structurally influencing F protein.

In the present study we can verify for the first time in Brazil the introduction of the N276S mutation in the population of HRSV of the subtype A in the Santa Casa de Misericórdia samples in the year of 2009 and its maintenance in the following year.

**Keywords:** *F Glycoprotein. MARM. HRSV. Palivizumab*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Genótipos documentados do Vírus Sincicial Respiratório Humano.....	22
<b>Figura 2-A-</b> Representação do Vírus Sincicial Respiratório Humano; <b>B-</b> Eletromicrografia do brotamento de um virion do HRSV a partir de uma célula infectada.....	23
<b>Figura 3</b> -Representação do Genoma do HRSV.....	24
<b>Figura 4</b> - Estrutura da proteína NS1.....	26
<b>Figura 5</b> - Estrutura da proteína N em complexo com o RNA viral.....	27
<b>Figura 6</b> -Estrutura pentamérica da proteína SH.....	30
<b>Figura 7-</b> Representação da Proteína G.....	32
<b>Figura 8-</b> Esquematização da atuação da proteína de fusão.....	34
<b>Figura 9-</b> Esquematização linear da proteína de fusão.....	35
<b>Figura 10-</b> Estrutura da proteína de fusão em sua forma pré e pós fusão.....	35
<b>Figura 11-</b> locais antigênicos identificados nas formas de pré e pós-fusão da proteína F.....	36
<b>Figura 12-</b> Estrutura da proteína M2-1.....	38
<b>Figura 13-</b> A= Regiões conservadas das proteínas L em vírus de fita simples negativa e não-segmentados destacando as funções RdRp (RNA polimerase RNA-dependente); PRNTase (Polirribonucleotidiltransferase); e MTase (Metiltransferase) <b>B=</b> Estrutura tridimensional da Proteína L de VSV.....	41
<b>Figura 14</b> - Processo de formação das formas filamentosas.....	44
<b>Figura 15-</b> Ciclo infeccioso do HRSV.....	46
<b>Figura 16-</b> Evolução da resposta de anticorpos humanos à infecção por HRSV das principais proteínas de superfície.....	48
<b>Figura 17-</b> A-Estrutura do palivizumabe; (141) <b>B-</b> Estrutura do Motavizumabe ligado ao epítipo do sítio A da proteína F de HRSV. L=Light Chain; H=Heavy Chain; P= Proteína F.....	51
<b>Figura 18-</b> Fluxo de trabalho.....	58
<b>Figura 19-</b> Cobertura sequencial das representativas parciais de HRSVA e HRSVB alinhadas com as suas respectivas sequências de referência. <b>A=</b> Alinhamento HRSVA; <b>B=</b> Alinhamento HRSVB.....	61

**Figura 20-** *A / B* =Estrutura 3D da proteína F na conformação de pré-fusão em suas formas de monômero e trímero respectivamente; *C/D*= Estrutura 3D da proteína F na conformação de pós-fusão em suas formas de monômero e trímero respectivamente; As regiões em azul das estruturas 3D das proteínas F mostram cobertura das sequências da Santa Casa e as vermelhas mostram a localização do Site

II.....62

**Figura 21-** Alinhamento de nucleotídeos das sequências representativas do sitio A. Abaixo, o Alinhamento de aminoácidos das representativas parciais de HRSVA e HRSVB representadas com a utilização da ferramenta Weblogo disponível em <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>. Sitio A em destaque (barra escura) ..... 62/63

**Figura 22-** Árvore filogenética das sequências representativas parciais com representantes dos genótipos retirados do banco de dados do NCBI. Em destaque a mutação N276S.*A*=HRSVA e *B*=HRSVB.....64

**Figura 23-** Mapa de calor extraído do servidor SNAP2 com a predição dos efeitos funcionais dentro e nos aminoácidos vizinhos ao sitio A.....75

**Figura 24-** Predição de efeitos estruturais ocasionados pelas mutações já descritas dentro do Sitio A para HRSVA e HRSVB respectivamente. O valor do pseudo  $\Delta\Delta G$  é considerável se for  $>0.5$  para aumento na estabilidade ou  $<-0.5$  para redução na estabilidade.....76



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1**-Matriz de interação entre as proteínas do HRSV. As marcações verdes indicam interação já descrita na literatura.....42
- Tabela 2**-Principais classes de agentes utilizados e ou em estudo para o tratamento/profilaxia do HRSV.....52
- Tabela 3**- Média de similaridade entre as sequências parciais representativas...66/67
- Tabela 4**- Predição de sítios de O-glicosilação para as 127 sequências de HRSV analisadas. As sequências de referência coletadas no banco de dados Refseq do NCBI para cada subtipo também foram utilizadas, porém nenhum sítio O-ligado foi predito.....73/74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGA - ADVANCED GENOME ALIGNER.

BP – Pares de base.

bRSV- Vírus Sincicial Respiratório Bovino

CCA – Chimpanzee Coriza Agent.

dN/dS- o mesmo que Ka/Ks.

FDA – Food and Drug Administration

FEL- Fixex Effects Likelihood- Preditor de Pressão seletiva

FUBAR – Fast, Unconstrained Bayesian Approximation for inferring selection (Ferramenta de análise de pressão seletiva).

GE- Sinal de Fim do Gene.

GS- Sinal de Início do Gene.

HRSV- Human Respiratory Sincicial Virus.

HVR- Região Hipervariável da Proteína de Adesão.

Hyphy- Hypothesis Testing using Phylogenies- Um pacote de software de código aberto.

Ka/Ks- Taxa de substituição não-sinônimas e sinônimas.

LVCM – Laboratório de Virologia Clínica e Molecular.

mAB – Monoclonal Antibody (Anticorpo monoclonal).

MARM – Monoclonal Antibody Resistant Mutant (Mutantes resistentes á anticorpos monoclonais).

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NS – Non-Structural

NT – Nucleotideo

ORF - Open Reading Frame

PDB – Protein Data Bank

Proteína F-Proteína de fusão do Vírus sincicial Respiratório Humano.

Proteína G- Proteína de Adesão viral.

PZV – Palivizumabe

QRT-PCR - Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

RdRp - RNA-dependent RNA polymerase

RefSeq- Banco de dados de sequências de referência do NCBI

Sanger – Método de sequenciamento de matéria genético

SDM- Site Directed Mutator

SH – Small Hydrophobic

SIFT2- Ferramenta web para predição funcional de alterações de aminoácidos em determinada proteína.

SNP – Single Nucleotide Polimorfism

SSE-Sequence editor database and Analysis platform (programa de alinhamento)

SsRNA - Single Stranded RNA

Stat1/Stat2- Proteínas transdutoras de sinal e activadoras da transcrição.

VSV- Vírus da Estomatite Vesicular

6HB- Six helix Bundle= Motivo estrutural de 6 alfa-hélices formadas durante a fusão da proteína F com a membrana.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Padrão de distribuição das mutações no banco de dados ao longo dos anos dentro do sitio A, e na posição do aminoácido 276 da proteína F em HRSVA.....60
- Gráfico 2-** Padrão de distribuição das mutações no banco de dados ao longo dos anos dentro do sitio A, e na posição do aminoácido 276 da proteína F em HRSVB.....60
- Gráfico 3-** Genotipagem das sequências deste trabalho.  
A=Genotipagem total da Santa casa com n° de 220; B= Genotipagem sequências representativas parciais com n° de 127.....65
- Gráfico 4-**Distribuição dos genótipos e da mutação N276S ao longo do tempo nas 223 sequências iniciais..... 65
- Gráfico 5- A, B, C=** Distância nucleotídica aos pares, por local entre as sequências de 2008, 2009 e 2010 respectivamente. A pequena linha escura abaixo indica a região do sitio A..... 68/69
- Gráfico 6-** Predição de pressão seletiva com FUBAR em HRSVA. Destacado com a barra cinza está o sitio A. Os pontos em vermelho indicam as regiões que foram preditas como estando sob seleção negativa/purificadora.....70
- Gráfico 7-** Predição de pressão seletiva com FUBAR em HRSVB. Destacado com a barra cinza está o sitio A. Os pontos em vermelho indicam as regiões que foram preditas como estando sob seleção negativa/purificadora.....71
- Gráfico 8-** Predição de sitio de N-Glicosilação na sequência da Santa Casa.....72

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	21
1.1 Histórico .....	21
1.2 Classificação e Estrutura .....	22
1.3 Genoma .....	24
1.4 Ciclo Infeccioso .....	43
1.5 Etiologia .....	47
1.5.1 Resposta Imunológica ao HRSV .....	48
1.6 Sazonalidade .....	49
1.7. Diagnóstico clínico .....	49
1.8 Tratamento.....	50
1.8.1. Perspectivas futuras.....	50
2. Justificativa.....	53
3. Objetivos .....	54
4. Material e métodos.....	55
4.1 Histórico das sequências analisadas .....	55
4.2 Montagem e Edição das sequências .....	55
4.3 Coleta das Sequências do Banco de dados do Genbank/Genotipagem e exclusão de redundância .....	56
4.4 Análises Evolutivas Moleculares.....	57
4.4.1 Distância Evolutiva e Análise de Polimorfismos.....	57
4.4.2 Análise de Pressão Seletiva.....	57
4.4.3 Predição de sítios de Glicosilação.....	58
4.5 Predição de possíveis efeitos funcionais e estruturais das mutações.....	58
5.1 Análise da frequência de mutações da proteína F no Banco de dados do NCBI .....	59
5.2 Representação da cobertura das sequências.....	60

5.3 Exclusão da redundância/ genotipagem .....	62
5.4 Variabilidade Molecular.....	66
5.4.1 Distância evolutiva e polimorfismos .....	66
5.5 Análise de Pressão Seletiva .....	69
5.6 Predição de sítios N e O-Ligados.....	72
5.7 Predição de efeitos funcionais e estruturais na proteína de fusão do HRSV. ..	75
6. Discussão e Conclusão .....	77
7. Referências Bibliográficas .....	81
APÊNDICE A.....	100
APÊNDICE B.....	103
APÊNDICE C .....	104
ANEXO 1.....	105
ANEXO 2.....	106



## 1. Introdução

### 1.1 Histórico

O HRSV ou vírus sincicial respiratório humano foi primeiramente isolado em 1956 por Morris e colaboradores em uma colônia de chimpanzés no laboratório médico Walter Reed Army Institute of Research em Washington DC-USA. Em outubro de 1955, uma doença respiratória aguda caracterizada por tosse, espirros e secreção nasal mucopurulenta acometeu 20 chimpanzés até então saudáveis. Morris e colaboradores descreveram desta forma o agente como Agente de Coriza de Chimpanzés, ou o inglês CCA (1).

Ainda em 1956, Robert Chanock e colaboradores descreveram um possível mixovírus que causava efeitos citopatogênicos em crianças com crupe. Graças a sua capacidade de formar sincícios em células infectadas, o vírus foi renomeado como HRSV ou vírus sincicial respiratório humano. Evidenciou-se posteriormente que o vírus teria sido transmitido de humanos aos chimpanzés pelo fato de um dos funcionários que trabalhavam com os chimpanzés ter apresentado um aumento na titulação de anticorpos anti CCA, na época do isolamento (2, 3).

Em 1967 uma tentativa fracassada de imunização com uma vacina inativada por formalina resultou em uma infecção mais severa com febre alta, broncopneumonia e sibilância em crianças que receberam esta vacina e entraram em contato com a estirpe selvagem do HRSV (4). Segundo alguns autores, provavelmente foi resultado de uma maior resposta de linfócitos Th2 e linfócitos citotóxicos, enquanto para outros, como Garofalo e colaboradores o acometimento bronquiolar determinante para a severidade da infecção é ocasionado por MIP-1 alfa (Proteínas inflamatórias de Macrófagos) (5). A eosinofilia foi relacionada inclusive a um peptídeo presente na proteína G do HRSV que compreende entre os aminoácidos 184–198 (6).

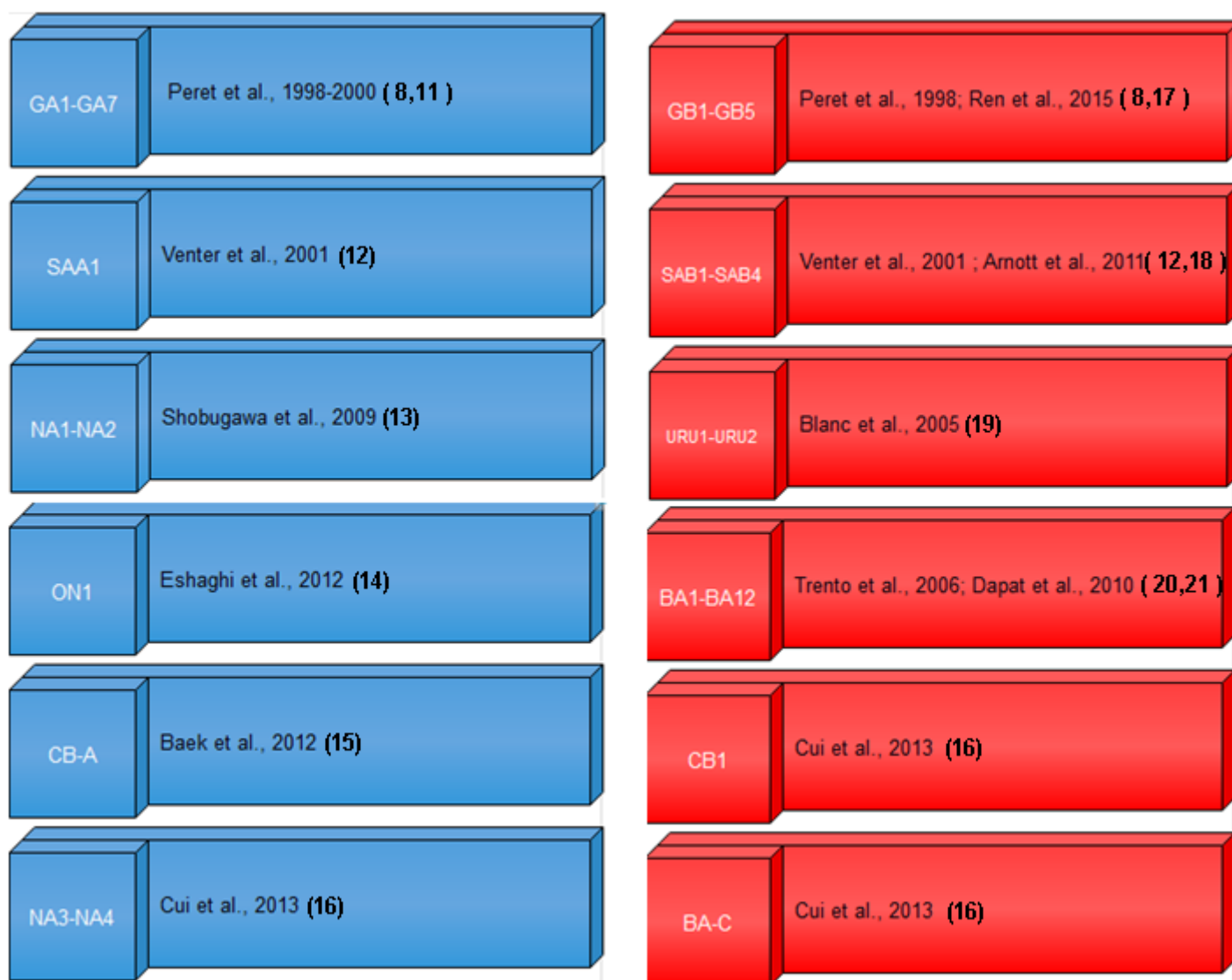
No ano 1985 Anderson e colaboradores conseguiram demonstrar uma modesta divergência antigênica entre dois grupos, que foram então classificados nos subtipos A e B (7) e posteriormente Peret e Sullender descreveram divergências gênicas e antigênicas dentro dos próprios subtipos (8, 9).



## 1.2 Classificação e Estrutura

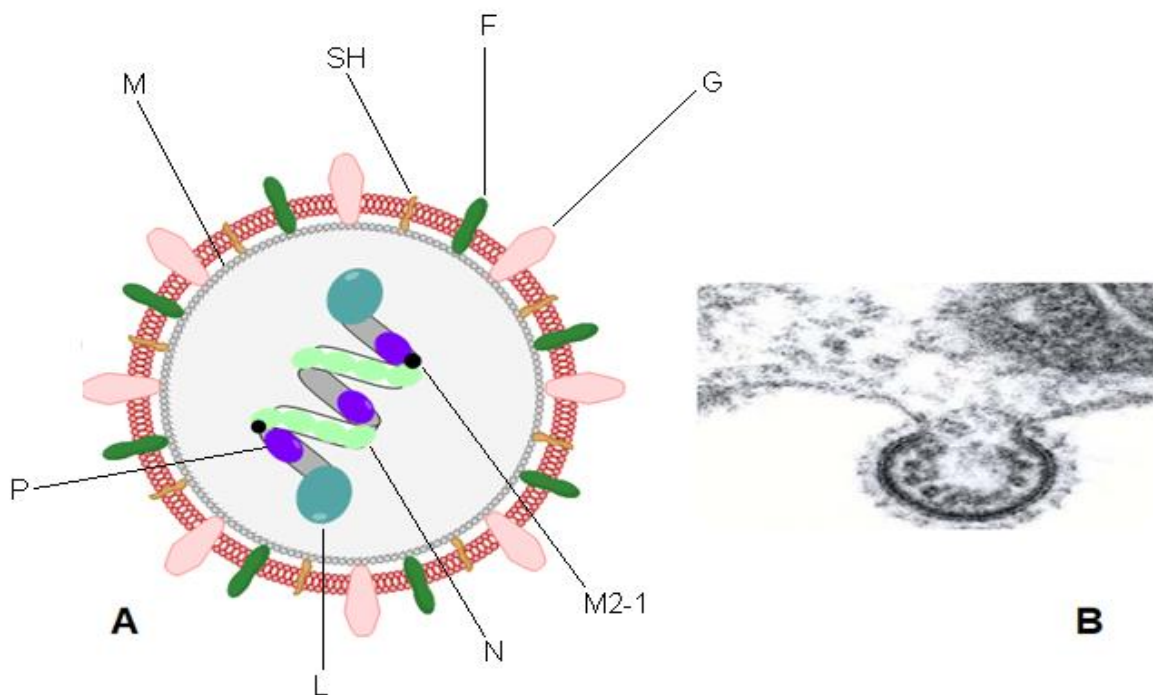
O HRSV pertence á ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae* e ao gênero *Orthopneumovirus* (10). Os subtipos do HRSV foram classificados em A e B de acordo com a divergência antigênica das proteínas G, F e N, e a partir da divergência de sequência de nucleotídeos dentro da segunda região hipervariável da proteína G foi possível classificar genótipos dentro destes subtipos (8). Atualmente foram documentados 14 genótipos para o subtipo A e 25 para o subtipo B. Os genótipos de cada subtipo estão representados abaixo em azul (genótipos de A), e em vermelho (genótipos de B)

**Figura 1** – Genótipos documentados do Vírus Sincial Respiratório Humano.



Estruturalmente trata-se de um vírus envelopado, pleomórfico, sendo por vezes esférico, outras filamentoso, dependendo da disposição da proteína da Matriz e outros fatores (22) que serão descritos mais adiante (ver página 44). O HRSV possui um virion que varia entre 150 e 300 nm e a forma filamentososa, que é predominante, tem o diâmetro de 80 a 100 nm podendo, ainda, alcançar de 4 a 8µm de comprimento. O virion contém no envelope as glicoproteínas responsáveis pela entrada do vírus á células alvo (23). A estrutura do virion está representada abaixo junto a uma micrografia eletrônica.

**Figura 2-A-)** Representação do Vírus Sincicial Respiratório Humano; **B-**Eletromicrografia do brotamento de um virion do HRSV a partir de uma célula infectada (24).



Estas Glicoproteínas de superfície são as Glicoproteínas SH, G e F, que terão suas funções discutidas ao longo deste trabalho.

Fonte: A) O próprio autor, data

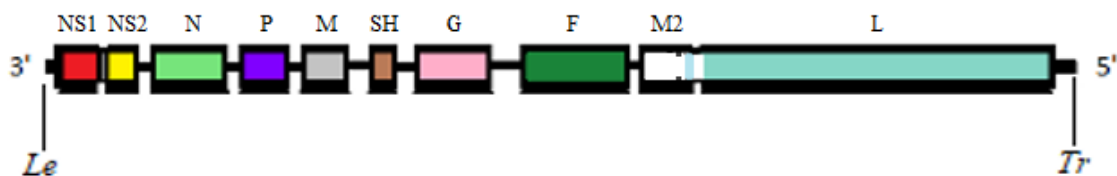
### 1.3 Genoma

O vírus possui o genoma linear, não-segmentado, de senso negativo, possuindo 15.200 pb na estirpe A2, contendo 10 genes que codificam para 11 proteínas, graças ao gene M2 responsável pela codificação das proteínas, M2-1 e M2-2. Este genoma possui, ainda, uma sobreposição de 68 nucleotídeos entre os genes M2 e L, que possivelmente tem a compactação da informação genica viral como uma das funções (25).

O genoma possui duas regiões promotoras denominadas *leader* e *trailer* nas extremidades 3' e 5' respectivamente, que contém o sinal de iniciação da transcrição e iniciação da replicação do RNA viral. Cada um dos 10 genes possui um sinal de início e fim de transcrição, que auxiliam a polimerase no processo transcricional (26, 27).

Os 10 genes que compõem o genoma viral são na sequência: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L como representado na figura abaixo. Os primeiros 9 genes são separados por regiões intergênicas não conservadas, que estão ausentes e dão lugar a uma sobreposição entre os genes M2 e L (26). Os genes são transcritos de forma decrescente, sendo a proteína NS1 a mais abundante e a L de menor abundância. (26). Em um trabalho realizado por Kuo e colaboradores em 1997 demonstrou-se esta atenuação, utilizando um análogo de genoma dicistrônico das proteínas de HRSV, porém mostrou que as regiões intergênicas não são responsáveis por este processo, tal como ocorre no VSV por exemplo (28).

**Figura 3** – Representação do Genoma do HRSV



Fonte: A) O próprio autor, data

Os sinais de início (GS) que direcionam a iniciação da transcrição, e o sinal de fim (GE) que direciona a terminação da transcrição e poliadenilação, são lidos pela polimerase viral com o intuito de transcreever os RNAs subgenômicos. Os primeiros 9 genes possuem um sinal de início de gene com uma sequência altamente conservada

de 10 nucleotídeos sendo ela 3\*-CCCCGUUUA (U / C) (sentido negativo). O sinal de início do gene L contém 3 diferenças, (3 \* -CCCUGUUUUA), comparando-se com a sequência de início conservada dos 9 genes anteriores, o que não altera em nada sua eficiência, conforme demonstrado em estudos anteriores. Os sinais GE demonstraram ser bem menos conservados do que os sinais de GS, tendo assim a sequência variável de 13 nucleotídeos a seguir 3'UCA (A/U)U(-/U/G)(A/U)(A/U)(U/A)UUUU. O traço indica ausência de consenso (28).



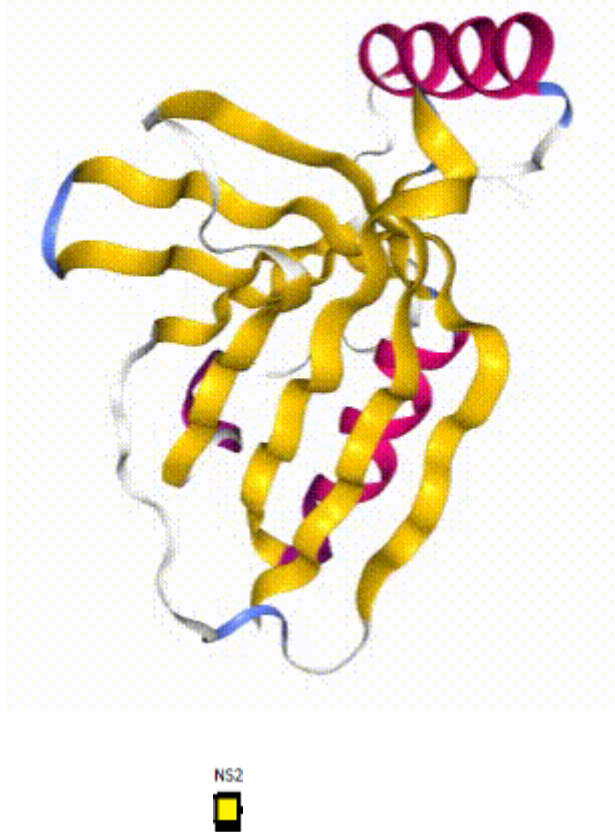
A região extragênica *leader* é a região promotora do genoma viral, possui 44 nucleotídeos. Esta região indica a transcrição, que produz mRNAs subgenômicos e sinaliza o primeiro passo da replicação de RNA, que produz um intermediário replicativo de comprimento total chamado antigênoma. Os primeiros 36 nucleotídeos da região *leader* são necessários para a replicação: Os 11 nucleotídeos iniciais da porção *leader* são responsáveis por recrutar a polimerase para iniciar a síntese de RNA, enquanto do nucleotídeo 12 ao 36 aumentam a eficiência de encapsidação dos transcritos de iniciação e permitem a geração de produtos de replicação completos (27).



O gene NS1 codifica para uma proteína de 139 aminoácidos, que é uma das proteínas não-estruturais do HRSV. Esta proteína atua como um antagonista da produção de interferon I e III, tem a capacidade de inibir a apoptose, suprimir o processo de maturação das células dendríticas (assim como NS2), além de regular transcrição do RNAm de células hospedeiras (29).

Anteriormente classificados como *Paramixovírus*, estes vírus parecem efetivamente antagonizar o sistema de interferon (IFN) através da inibição da geração de IFN ou do bloqueio de componentes de transdução de sinal de IFN como Stat1 e Stat2 (30). Além disso Atreya e colaboradores demonstraram em um trabalho do ano de 1998, que a proteína NS1 atua regulando negativamente, de forma eficiente a transcrição e replicação de RNA do HRSV (31).

**Figura 4** – Estrutura da proteína NS1 (32)



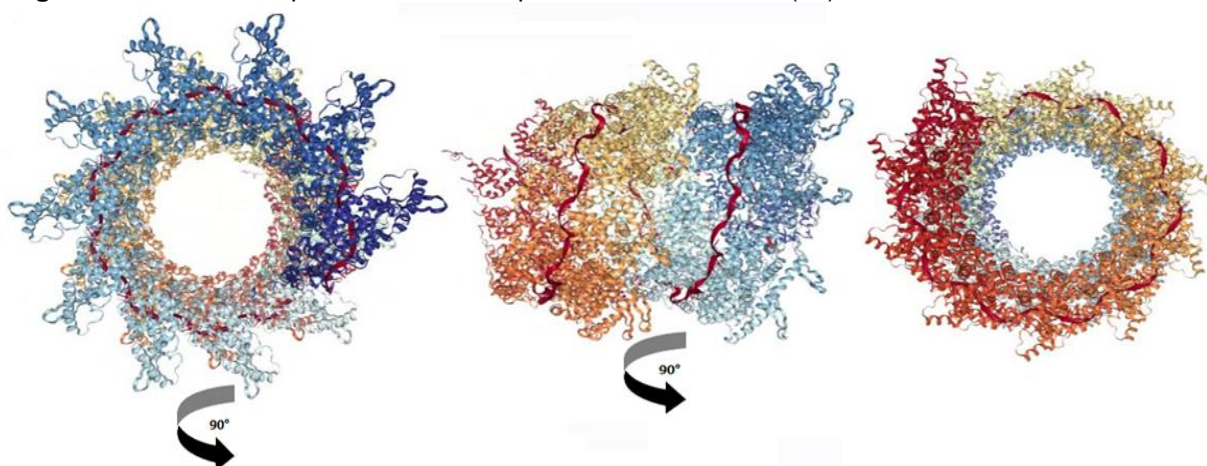
O gene NS2 codifica para uma proteína de 124 aminoácidos. Esta proteína não estrutural atua, assim como a NS1, bloqueando a sinalização de interferon e assim ocasiona a degradação de STAT2 (30,33). Também atua inibindo na maturação de células dendríticas assim como NS1 (34). Trabalhos recentes atribuíram a esta proteína algumas características que influenciam na patogênese da infecção por HRSV. Liesman e colaboradores notaram que a infecção resultava em arredondamento celular, degradação ciliar e eliminação destas células defeituosas, tornando o epitélio mais susceptível a patologias futuras, devido ao reduzido funcionamento do transporte mucociliar. A extrusão destas células pleomórficas resulta em acumulação das mesmas no lúmen bronquiolar de diâmetro curto, o que leva a obstrução aguda do aparato respiratório distal. Este fenômeno é exacerbado pela mediação de NS2, aumentando a migração dos neutrófilos até a região onde estão estas células (35).



O gene N codifica para uma proteína de 391 aminoácidos. Esta proteína envolve o RNA genômico viral formando um nucleocapsídeo helical de anéis decamericos (32) e impedindo que ele sofra mudanças conformacionais, como a formação de alças, além de protege-lo contra a degradação por RNAses. Estruturalmente cada unidade monomérica da proteína possui um domínio C e um domínio N terminal separados por uma dobradiça. Cada monômero da proteína N está associado com 7 nucleotídeos do RNA viral, com o sulco de RNA na dobradiça. Os monômeros adjacentes orientam-se na mesma direção e estão conectados de forma a proporcionar flexibilidade facilitando o acesso da polimerase sem desmontar a hélice. Dos sete nucleotídeos associados a cada monômero da proteína N, 2-4 são orientados para o interior enquanto os outros 4 estão direcionados para a parte externa. A passagem da polimerase pode induzir um movimento de dobradiça transiente que faz com que os três nucleotídeos ocultos se tornem acessíveis (32).

Uma outra função há pouco tempo descrita para esta proteína é a de atuar antagonizando o sistema imune inato do hospedeiro ligando-se a proteína quinase ativada por RNA (PKR), inibindo a fosforilação do fator de iniciação de translação eucariótica (eIF2 $\alpha$ ), e conseqüentemente não interrompendo a tradução do RNA mensageiro (36).

**Figura 5** - Estrutura da proteína N em complexo com o RNA viral (32)





O gene P codifica para uma fosfoproteína de 241 aminoácidos, fosforilada nas serinas localizadas nas posições 116,117,119,232 e 237 pela caseína quinase II celular, processo este que demonstrou ser essencial para a atividade de alongação da transcrição pela polimerase viral (37).

Esta proteína que faz parte do complexo RNA polimerase RNA-dependente composto por P, L, M2-1 e M2-2 (38), sendo um cofator essencial da polimerase, posicionando a proteína L no complexo ribonucleoproteico (RNA e N), interagindo neste complexo e garantindo especificidade no processo de encapsidação do RNA viral ao ligar monômeros livres de proteína N em genomas e antigenomas recém gerados (39).

Curran e colaboradores em seus estudos mostraram como a proteína P atua como uma espécie de chaperona para a proteína N em sua forma imatura, chamada N0 (40). A proteína P, juntamente com a proteína N são responsáveis pela formação de corpúsculos de inclusão citoplasmática. Sugeriu-se que estes corpúsculos são os locais de síntese de RNA viral. Além disso juntamente com L e N, a fosfoproteína P constitui o mínimo essencial para a replicação do RNA viral (41). A proteína P apresenta a estrutura de um homotetramero formado através de um domínio de multimerização no meio da molécula, que é flanqueada por domínios intrinsecamente desordenados, sendo que a região responsável pela interação com o nucleocapsídeo é a região C-terminal da proteína (39,42).



O gene M codifica para uma proteína de 256 aminoácidos, fosforilada, a proteína da matriz viral. Esta proteína é a principal responsável pela montagem viral, coordenando a morfologia do virion e participando do processo de brotamento do vírus Maduro (43). A proteína de Matriz é responsável também por definir a estrutura viral, e durante a infecção viral, está presente em corpos de inclusão citoplasmática estando também associada ao complexo RNP contendo proteínas N, P, L e M2-1 em células infectadas, interagindo com as glicoproteínas do envelope na montagem e no virion maduro (43).

Um fato curioso foi descrito por Ghildyal e colaboradores de que esta proteína também pode estar presente no núcleo celular, porém seu papel nesta região não está

completamente esclarecido. Sabe-se que, além das funções descritas anteriormente, a proteína da matriz tem o papel de interromper a transcrição viral, através da inibição da ação da transcriptase do nucleocapsídeo antes da embalagem do virion e mediar associação entre o nucleocapsídeo e o envelope viral (43,44,45,46). O papel da fosforilação e desfosforilação ainda não é bem compreendida na proteína de matriz, porém sabe-se que este processo regula a sua função, e a alternância destas formas ainda é objeto de estudo. Bajorek e colaboradores demonstraram que existe um sítio crítico de fosforilação na Treonina 205 que é responsável por modular a oligomerização de M e conseqüentemente diminuir o sucesso da liberação viral. (47)

Trabalhos posteriores demonstraram que esta proteína é um monômero, porém, em 2015, Forster e colaboradores descreveram o processo de dimerização da mesma, também mostrando que este processo é requerido para o sucesso da liberação viral, através de análises em que a desestabilização dos dímeros, acarreta em redução da liberação de partículas virais (48).

SH

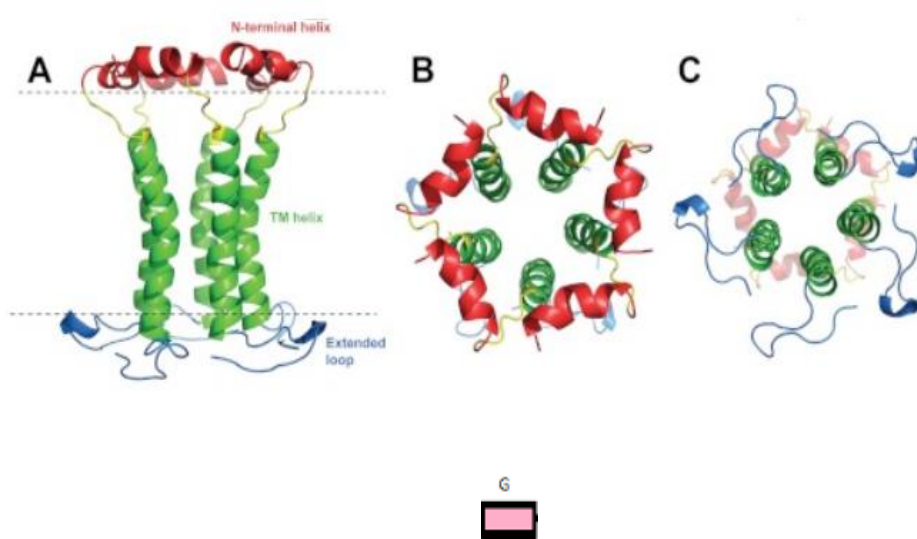


O gene SH codifica para uma proteína de 65 aminoácidos. Esta proteína contém uma única região transmembranar do tipo II, com um C-terminal extracelular e um terminal N intracelular (49), formando um oligômero pentamérico estruturado de modo a formar canais iônicos (50). Estudos anteriores apontaram duas possíveis funções desta proteína, podendo ter um papel na fusão ou alteração da permeabilidade membranar, embora seu papel na replicação e patogênese não esteja completamente clara, sendo que as funções descritas acima são reforçadas pelo fato desta proteína ser encontrada no interior das balsas lipídicas de membranas plasmáticas, RE e Complexo de Golgi, estando concentrada em maior quantidade nestes dois últimos, além de ser incorporada em pequenas proporções nos virions maduros (51). Estudos anteriores identificam variados tipos desta proteína, dentre eles uma forma truncada na porção N-terminal e duas variantes que possuíam sítios de N glicosilação, uma destas sendo ainda modificada por polilactosaminas (52), embora a forma completa e não glicosilada seja relativamente mais comum. Em 2013 Triantafilou e colaboradores demonstraram que esta viroporina também é responsável por induzir respostas imunológicas via ativação de inflamassomas, além de otimizar a infecção viral e permitir a apoptose em células infectadas (53), porém Fuentes e colaboradores reportaram que



esta proteína inibe apoptose induzida por TNF-alfa (54). Yasui e colaboradores utilizando plasmídeos de expressão com as 3 glicoproteínas de superfície viral e com a expressão da proteína de fusão na superfície celular, demonstraram que a presença da proteína SH induziu o fusionamento mais eficiente da proteína F do que quando esta última é expressa sozinha (55).

**Figura 6** - Estrutura pentamérica da proteína SH (50)



O gene G codifica para uma proteína de 289 a 299 aminoácidos, dependendo da estirpe viral (56). Trata-se da proteína responsável pela adesão viral a célula hospedeira, e primeira a entrar em contato direto com a mesma. Esta proteína é altamente glicosilada, possuindo de 30 a 40 sítios de O-Glicosilação e 4 a 5 sítios para N-glicosilação, sendo que, aproximadamente 60% de massa molecular é composta de carboidratos (57). A proteína G é um oligômero composto pelos domínios transmembrana, citoplasmático e o ectodomínio, este último possuindo ainda 2 regiões hipervariáveis, denominadas HVR1 e HVR2, separadas por uma região central conservada de 13 aminoácidos que se sobrepõe parcialmente a um nó de cisteína com 4 cisteínas ligadas 1-4 e 2-3 (58) que não é essencial para a eficiência da infecção viral (59). Em 1987 um estudo realizado por Hendricks e colaboradores identificou uma forma solúvel da proteína G (sG), além da forma membranar, que é sintetizada a partir de um segundo códon de iniciação AUG alternativo no códon 48 dentro do gene G, e é liberado no meio celular antes mesmo da liberação dos virions. (60,61,62). Esta forma

solúvel é uma proteína truncada, não possuindo o domínio citoplasmático e uma pequena porção do domínio transmembrana, tendo assim de 225 a 234 aminoácidos, que após ser traduzida fica associada ao lúmen do RE até que um algum evento proteolítico desconhecido a libere no meio. Não se sabe por que só a forma truncada da proteína passa por este processo, ficando retida no RE, ao ponto que a forma membranar completa (mG), após a tradução, transcorre o lúmen e é direcionada ao complexo de Golgi. Esta forma pode ser detectada 6 horas após a infecção enquanto mG só é detectada após 12 horas da infecção, tempo relativo a etapa de eclipse viral do HRSV. Sendo assim, esta proteína é segregada por células já infectadas no meio, estando também em maior concentração que mG (61,62).

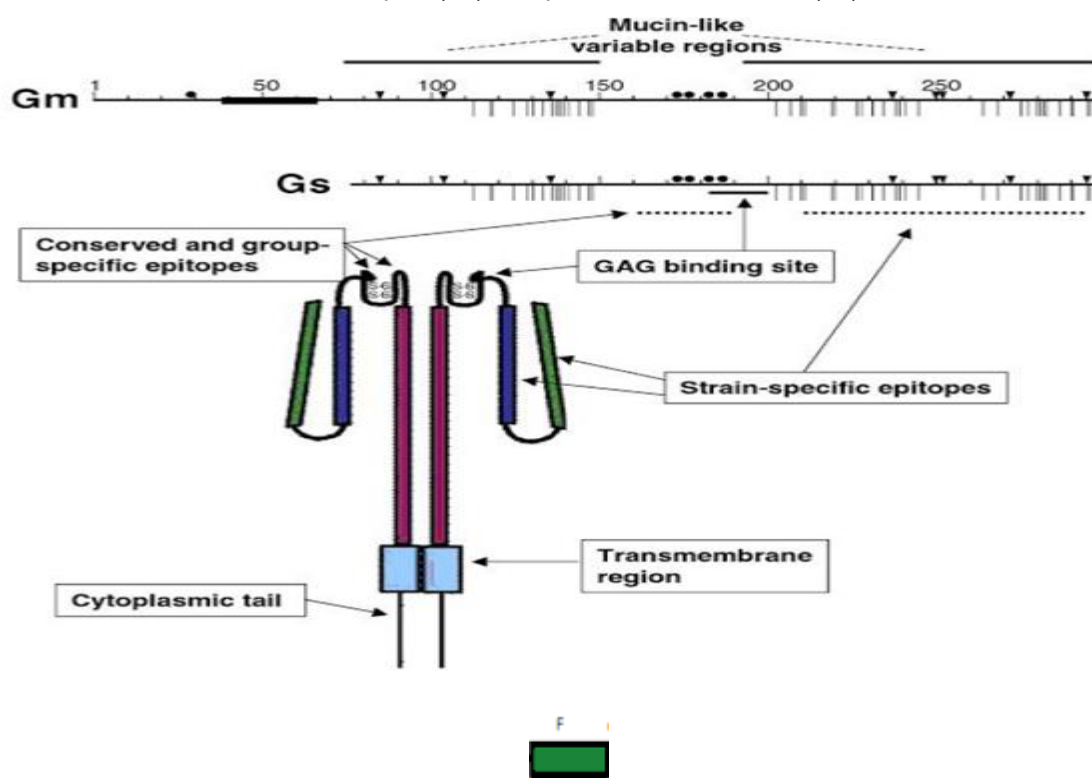
O papel da forma sG ainda é objeto de estudo. Porém alguns trabalhos já demonstraram que esta forma atua auxiliando o vírus a evadir a resposta imune do hospedeiro, realizando uma obstrução antigênica de modo a ocupar anticorpos neutralizantes, reduzir a atividade inflamatória além de inibir os efeitos antivirais decorrentes da ação de anticorpos em macrófagos pulmonares e no sistema complemento, atuando como uma “distração” para o sistema imune (63,64).

A glicoproteína G é a proteína mais variável do HRSV. O alto grau de variação destas regiões, também chamadas de mucina-like graças a sua similaridade com as mucinas produzidas no aparelho respiratório, conferem uma grande diversidade imunogênica, dificultando a ação do sistema imune do hospedeiro, sendo uma proteína muito flexível á substituições de aminoácidos (HVR1) e inserções/deleções/duplicações (HVR2) (65). Esta flexibilidade permitiu ao vírus evoluir ao ponto de se inserir na região HVR2 uma duplicação de 60 nucleotídeos ou 20 aminoácidos (259-279) no subtipo B, isolados inicialmente em 1999 em Buenos Aires (marcando o surgimento do clado BA (20,66) e 72 nucleotídeos no subtipo A na mesma região, descrito em 2010 em Ontário (marcando o novo genótipo ON1) (14). O grupo de Comas Garcia sugeriu que este processo ocorreu em pelo menos 3 eventos de duplicação independentes, baseando-se nos motivos sequenciais GXXSPSQ presentes na região de duplicação da proteína (67).

Esta proteína tem como receptores os glicosaminoglicanos de superfície celular, mais precisamente o sulfato de heparano que possui semelhança estrutural com a heparina, através de um domínio ligador de heparina HBD localizado entre os aminoácidos 184-198. Tripp e colaboradores demonstraram que a proteína G do HRSV compete com a quimiocina CX3CL1, ligando-se ao receptor desta, que é CX3CR1

através dos nós de cisteína presentes na região central conservada e graças à similitude entre esta região com o motivo CX3C das quimiocinas, mimetizando sua ação e afetando a quimiotaxia dos leucócitos pulmonares (68). A região central conservada de G seria responsável por modular também a expressão de miRNAs do hospedeiro, alterando a resposta à infecção, graças a sua homologia estrutural com os receptores de TNF alfa, inibindo a apoptose (69). As proteínas surfactante A (SP-A) e Anexina II também são possíveis receptores para a proteína G, porém precisam de estudos mais aprofundados e examinados *in vivo* (70).

**Figura 7-** Representação da Proteína G. Escribano Romero e colaboradores descrevem que a forma membranar (mG) provavelmente é um tetrâmero, enquanto a forma solúvel truncada (sG) demonstrou ser um monômero nas células HEp-2. (71). Adaptado de Melero 2006 (72)



O gene F codifica para uma proteína de membrana integral do tipo I de 575 aminoácidos. Esta proteína é responsável pela fusão do envelope viral a membrana da célula hospedeira, além de induzir a formação de sincícios nas células do tecido infectado. Esta proteína é codificada como um precursor inativo F0, que são clivadas em duas regiões por uma furina do hospedeiro através de um sítio de 27 aminoácidos próximo a porção N-terminal da proteína nos aminoácidos 106-109 e 131-136 respectivamente (72). Este processo de clivagem, embora não ocorra com uma precisão de 100%, o que acaba resultando em elementos parcialmente clivados apenas no local I

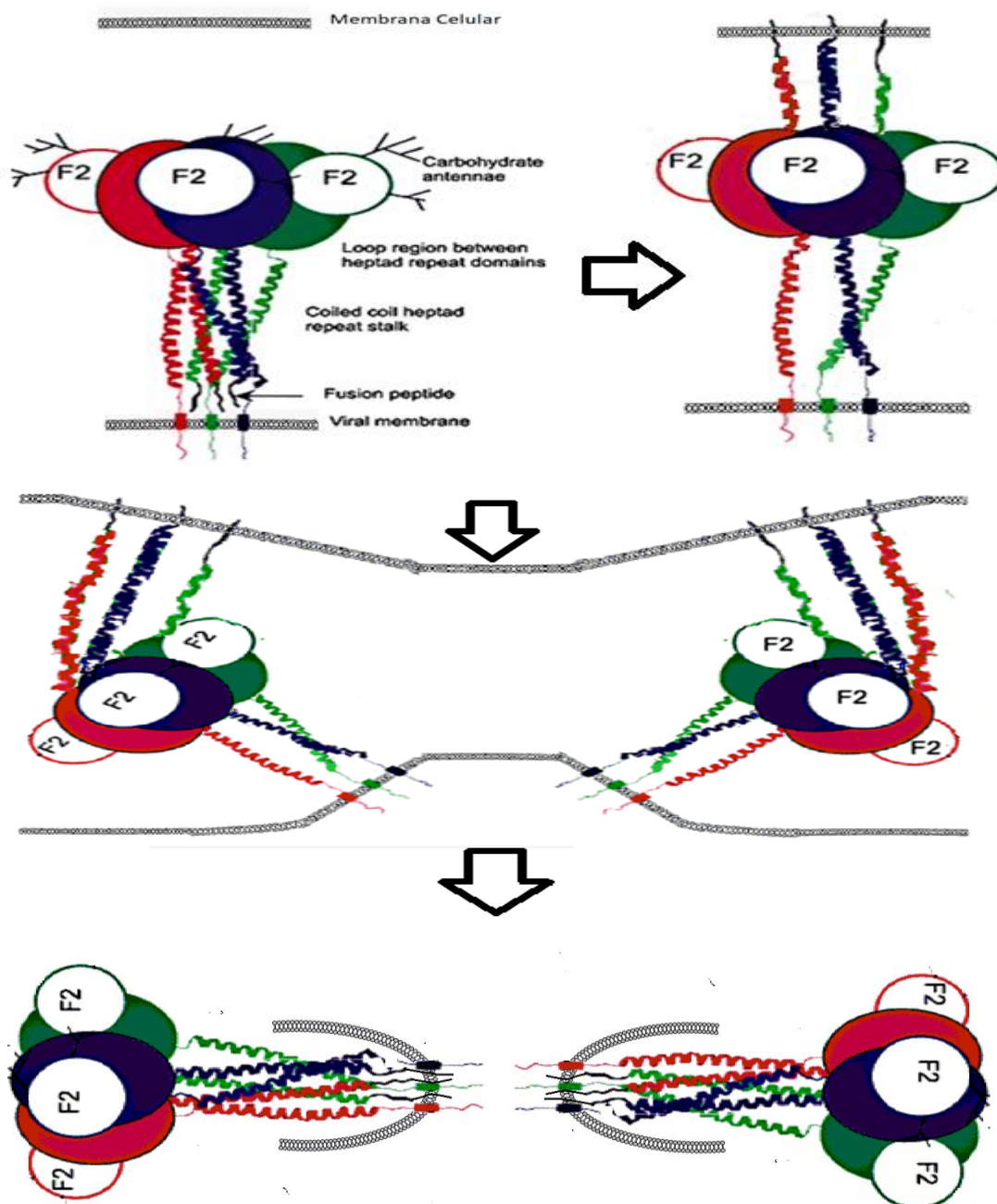
ou no local II, demonstrou ser essencial para a função de fusão e conseqüentemente formação dos sincícios, bem como a manutenção da integridade estrutural da proteína. Desta forma estes elementos imaturos são encontrados normalmente na superfície viral juntamente com as formas completamente processadas da mesma (73). O processo de clivagem completo resulta numa proteína com duas porções estruturais denominadas F2 (porção N-proximal) e F1 (porção C-proximal) unidas por duas pontes dissulfeto (74). Trata-se um homotrîmero em sua forma madura, composto por três regiões de sequências heptadas (HRA, HRB, HRC). A proteína é composta por 3 domínios, sendo eles os domínios Citoplasmáticos, Transmembrana e Ectodomínio, além de subdomínios no interior deste último. Uma sequência composta por 19 aminoácidos compõe o peptídeo de fusão, contendo resíduos hidrofóbicos, que como o nome sugere é inserido na membrana hospedeira após a alteração conformacional de F (75). Tanto a forma de pré como pós fusão contém uma haste e uma cabeça característicos. Esta proteína é liberada das células hospedeiras na sua forma de pré-fusão, metaestável e após a interação de F com os receptores celulares a mesma sofre uma arrojada modificação estrutural passando para a forma de pós-fusão, inserindo os peptídeos na membrana, e após a formação de hairpins e do fold 6-Helix Bundle (6HB) formando uma molécula estável e num processo irreversível, propiciando a fusão das membranas, ocasionando assim a liberação do nucleocapsídeo no interior da célula (74). Ainda não está claro o que ocasiona esta modificação.

A Nucleolina foi descrita como sendo um dos principais receptores do HRSV em 2011 por Tayyari e colaboradores (76). Ao contrário da glicoproteína G, esta proteína possui um alto grau de conservação entre os isolados A e B, possuindo uma identidade de sequência de 90% ou mais, e concentrando sua variação no sítio antigênico Ø, na porção F1 dos aminoácidos 196 ao 210 e numa alfa hélice localizada entre os aminoácidos 62 a 69 da porção F2, podendo este local estar relacionado com a imunidade específica dos subtipos (57). Diversos fatores incluindo conservação e o fato de ser uma proteína essencial para a entrada do vírus na célula, e os avanços no conhecimento dos processos que permitem a sua mudança conformacional tornaram esta proteína um alvo terapêutico ideal para o tratamento da infecção pelo HRSV. A organização estrutural da proteína F está ilustrada nas figuras 8,9 e 10.

Desde meados da década de 90 a proteína F vinha sendo um dos principais alvos terapêuticos, principalmente com a expansão do uso de anticorpos monoclonais. O anticorpo monoclonal palivizumabe da empresa Synagis, liberado para uso como

medicamento no ano de 1998 e utilizado até hoje como medicamento profilático em crianças prematuras, com problemas cardiorrespiratórios congênitos e problemas respiratórios crônicos (77,78)

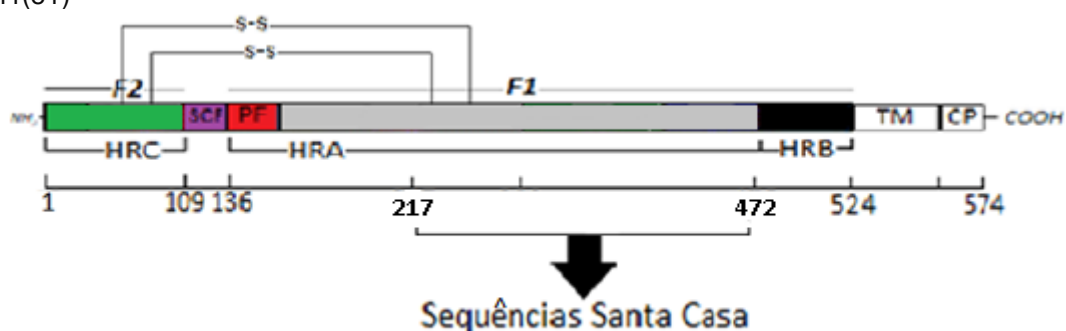
**Figura 8** – Esquematização da atuação da proteína de fusão. Adaptado de Drugs of Future 2000(78)



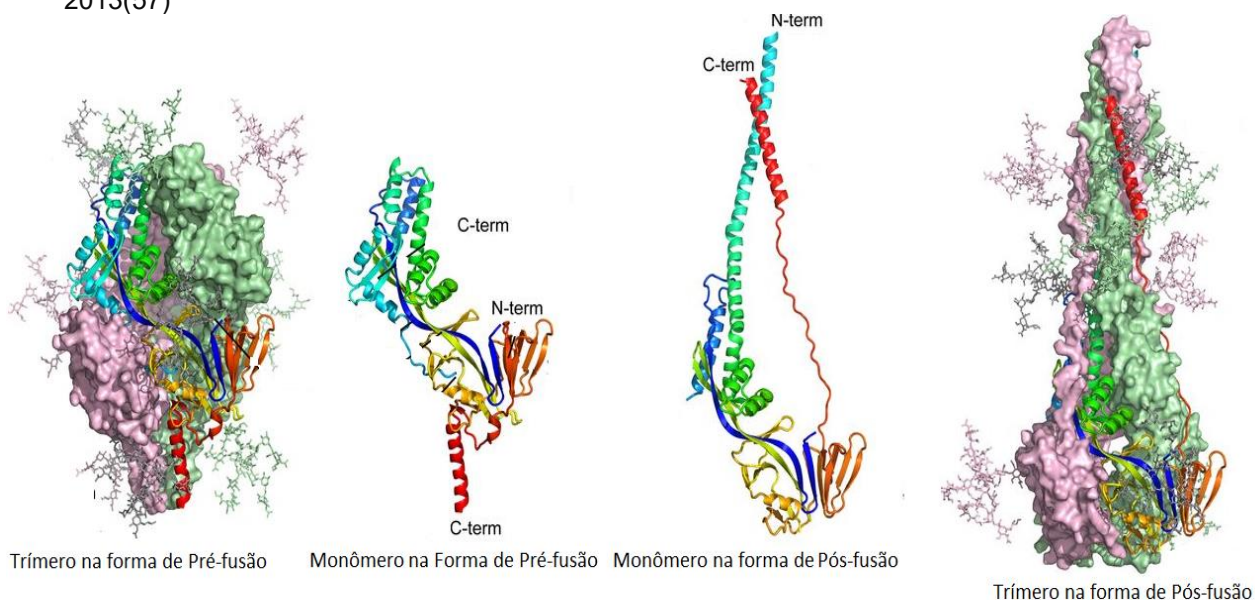
Low e colaboradores em 2008 sugeriram que as proteínas F e G interagem formando um complexo proteico no envelope viral, antecedendo o processo de fusão propriamente dito (79). Um dos fatos que reforçariam esta ideia seria que tanto a proteína G como a proteína F são capazes de interagir com o sulfato de heparano. Estes

dados sugerem que a proteína F também teria um papel na adesão e/ou G também teria um papel na fusão do envelope. As interações destas proteínas garantiriam o sucesso do processo de adesão e de fusão (79). Porém isto ainda não está tão claro, pois como citado a proteína G, assim como SH não são essenciais para a infecção in vitro do HRSV (80).

**Figura 9-** Esquematização linear da proteína de fusão, mostrando as regiões de motivo estrutural heptadas presentes no ectodomínio (HRA, HRB e HRC); Os domínios transmembrana (TM) e citoplasmático (CP); Sítio de clivagem de furina (SCF); Peptídeo de fusão (PF) e por fim as duas pontes de enxofre responsáveis por manter a ligação entre as porções F1 e F2. Adaptado de Swanson et al 2011(81)



**Figura 10-** Estrutura da proteína de fusão em sua forma pré e pós fusão. Adaptado de McLellan et al 2013(57)

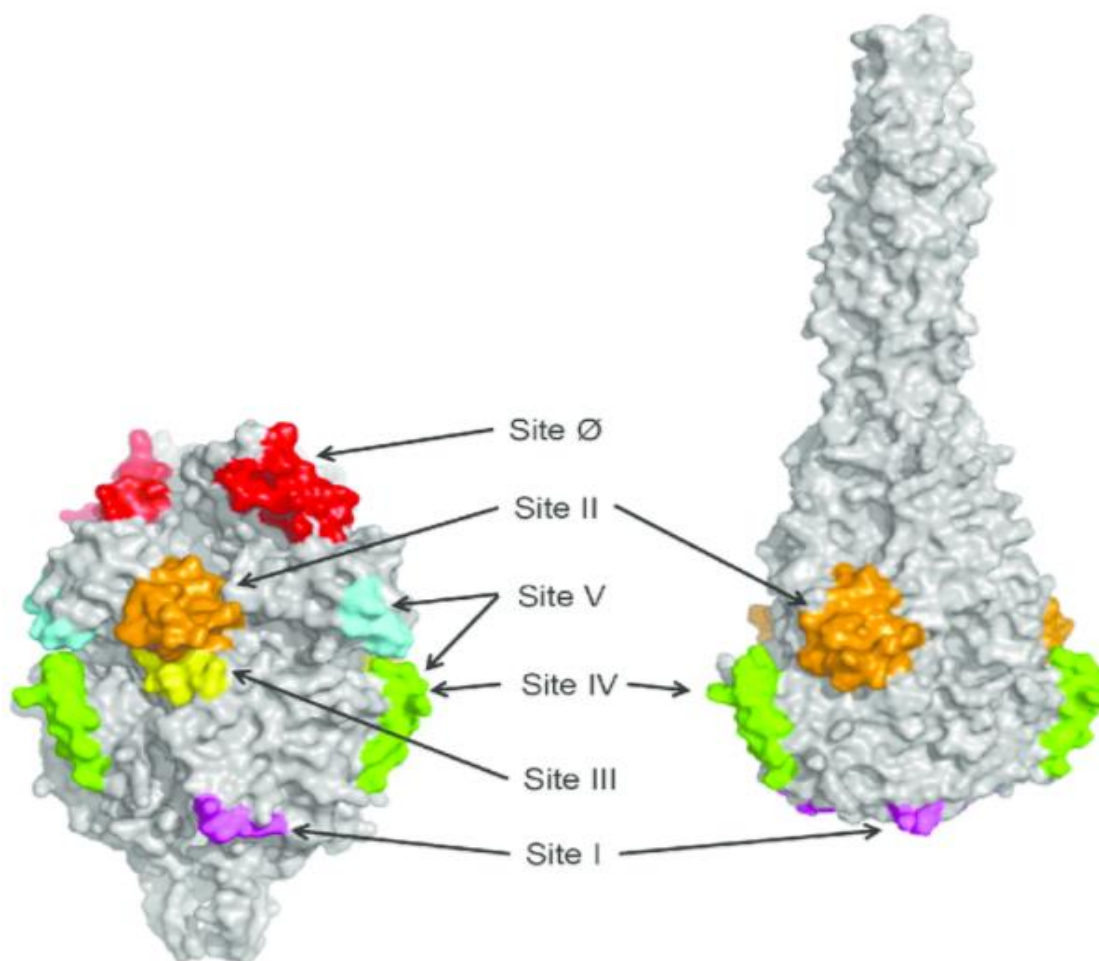


A proteína F juntamente com a proteína G possui características antigênicas de interesse no estudo da imunoprofilaxia por conter os epítomos alvos de anticorpos

neutralizantes (82,83). Beeler e colaboradores (84) e, posteriormente Arbiza e colaboradores (85) identificaram, mapearam e caracterizaram os epítomos e os sítios antigênicos em 1989 e 1992. Estes estudos mostraram que os anticorpos neutralizantes têm como alvo dois epítomos distintos sendo o sítio antigênico 2 (também nomeado sítio antigênico A), que abrangem do aminoácido 255 ao 275 (84,85), sendo o sítio de atuação de alguns anticorpos monoclonais como o palivizumabe e o seu derivado motavizumabe.

O sítio antigênico IV (nomeado também de sítio C) compreende entre os resíduos de aminoácidos 422 a 438 (72, 73) sendo alvo dos mABs Mab19 (sem resultados satisfatórios), e 101F, tendo bons resultados até o momento. A figura abaixo ilustra o mapa antigênico das formas de pré e pós-fusão da proteína F de HRSV.

**Figura 11-** Locais antigênicos identificados nas formas de pré e pós-fusão da proteína F. (74)





O gene M2 codifica para duas proteínas denominadas M2-1 e M2-2. A primeira é um cofator essencial do complexo da RNA polimerase viral, ligando-se aos componentes deste complexo, bem como ao RNA, (formando o complexo de holonucleocapsídeo), atuando no processamento da transcrição, bem como age como um fator de antiterminação, para gerar o antigenoma. Ao contrário da replicação, a transcrição do RNA viral requer a proteína M2-1, que atua como “acelerador” no processo de transcrição que irá gerar o antigenoma, através de um motivo de dedo de zinco essencial para “ligar” a função antiterminação e permitir que a proteína interaja com o RNA, este motivo fica localizado na porção N-terminal da proteína M2-1 (86).

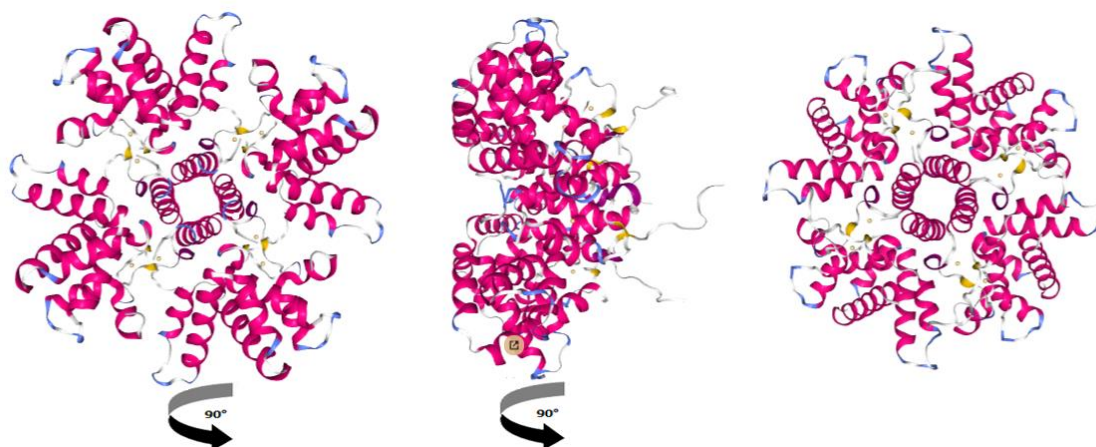
M2-1 é uma proteína composta por 194 aminoácidos que formam um tetrâmero, tendo as formas fosforilada (em menor quantidade) nas regiões Thr56, Ser58 e Ser61, sendo esta fosforilação importante para a função proteica, mas não para a interação à N ou RNA (87). Existe também a forma não fosforilada no interior celular (88). O papel desta fosforilação ainda não é conhecido, porém um estudo demonstrou que quando células são transfectadas expressando M2-1 na ausência de P, predomina a forma fosforilada da M2-1, o que sugere que a fosforilação pode ser modulada pela interação destas duas proteínas, isso também fortalece os resultados evidenciados por Cartee e colaboradores, de que a fosforilação da proteína M2-1 é essencial para a função de antiterminação, não sendo porém essencial para a ligação ao RNA ou a proteína P (87). Além disso segundo Thi-Lan Tran a fosforilação pode influenciar no estado oligomérico desta proteína (89).

Esta proteína está associada a corpos de inclusão citoplasmática juntamente com P, N, L e M, interagindo com as mesmas, porém as dinâmicas destas interações ainda não são completamente compreendidas. Fearn e colaboradores utilizando minigenomas, demonstraram que a síntese de RNAm policistronicos exige uma maior concentração da proteína M2-1 em comparação à síntese de RNAs monocistronicos, citando inclusive que na ausência de M2-1 a leitura direta não ocorre (90,91). Trabalhos posteriores demonstraram que, nesta mesma síntese de RNA policistronicos, a proteína atua em diferentes magnitudes entre os sinais GE (86). Isto porque como demonstrado por Kuo e colaboradores alguns sinais de fim de gene (GE) são menos eficientes do que outros, por exemplo, citaram os sinais de fim de gene de NS1 e NS2



como sendo menos eficientes que os demais (28). Conseqüentemente em células infectadas pelo HRSV a leitura de sinal de fim de genes através das junções dos genes NS1-NS2 e NS2 e N tem uma leitura de corrida maior, ou seja, a polimerase tem um maior processamento nestas regiões. A análise bibliográfica expõe duas possíveis formas de atuação da proteína M2-1 como duas características distintas: Ela seria um fator de processibilidade, ou seja, atuaria inibindo as pausas da polimerase, e permitindo a síntese da fita inteira de RNAm; e também atuar como um fator de antiterminação, inibindo a terminação da polimerase de forma a impedir a liberação do transcrito nascente (86,90,91). O grupo de Fearn ainda classificou a atuação de antiterminação de M2-1 em antiterminação intragênica e antiterminação GE, sugerindo que atuação de M2-1 com a polimerase, bem como sua concentração diferem nestes dois momentos distintos (90).

**Figura 12-** Estrutura da proteína M2-1(92).



M2-2 é uma proteína de 90 aminoácidos codificada pela segunda ORF presente no gene M2. Trata-se de uma proteína não-estrutural e não essencial, que atua como um fator regulatório, segundo Collins e colaboradores em seus estudos com minigenomas, a ausência de M2-2 ocasionou uma diminuição de RNA genômico e antígenômico, e acúmulo de RNAm transcrito, sugerindo que o mesmo atua como fator regulatório negativo sobre a transcrição, no final da infecção, e um fator regulatório positivo para a replicação. Basicamente funcionando como um “interruptor”, equilibrando a alternância da transcrição para a replicação de RNA. Supõe-se que o efeito regulatório negativo depende da concentração de M2-2, e ocorre em torno de 12 a 15 horas após a infecção (93).



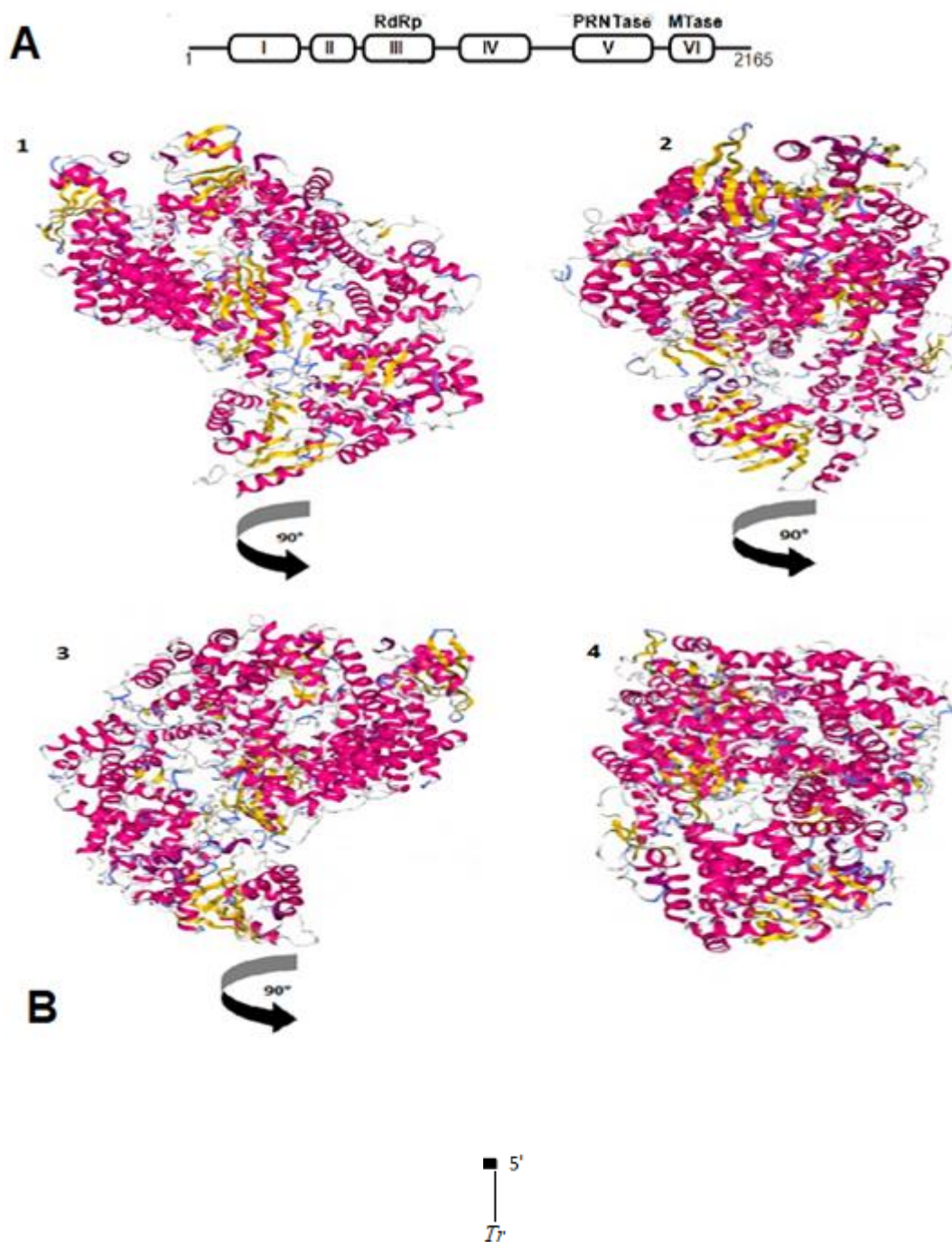
O gene L que possui uma sobreposição de 68 nucleotídeos com o gene M2, ou 45 nt mais a inclusão dos sinais de início de L (10 nt) e fim de gene de M2 (13 nt) (94,95,96). Este gene contém um único código de leitura aberto que codifica para uma proteína de 2165 aminoácidos, rica em Leucina e Isoleucina, sendo a maior proteína codificada pelo genoma viral (94). Não está claro ainda como a polimerase acessa o sinal GS da proteína L visto que esta se encontra intracistronicamente em M2, pois a transcrição do RNA viral possui apenas uma região promotora localizada na porção *leader 3'*, bem como também “ignora” o sinal de fim de M2 que se encontra intracistronicamente em L para produzir um transcrito completo desta última proteína. Uma resposta para a última questão, vem de um trabalho de Collins em 1987 no qual os mesmos demonstraram que 90% dos transcritos gerados pela leitura de L são truncados, pois a polimerase termina sua leitura prematuramente graças ao sinal de fim de gene de M2, que como descrito acima está internamente a L (95). Por isso os autores deste trabalho concluíram que o sinal interno de terminação/ poliadenilação de M2 é um atenuador da transcrição do gene L. Posteriormente em um ensaio de transcrição intracelular, realizado por Fearn e colaboradores descreveram que a polimerase escaneia o sinal GE de M2, para depois retornar até o sinal GS de L, realizando uma varredura na sobreposição. O trabalho sugeriu assim que o sinal GE de M2 é essencial para a transcrição de L, além do próprio sinal GS de L (96).

Esta proteína possui seis regiões conservadas, identificadas de I a VI, comuns não só a ordem *Mononegavirales* como outros vírus de RNA de senso negativo e não-segmentado (97,98). Além da atividade de polimerização outras funções foram atribuídas a proteína L destes Mononegavirales. Foram identificadas regiões com funções de *capping*, metilação e poliadenilação. Como ilustrado nas figuras abaixo, estas funções presentes nestes domínios conservados são a RdRp (RNA polimerase RNA-dependente), que é responsável pela função de polimerização dos ribonucleotídeos; PRNTase (GDP-Polirribonucleotidiltransferase), que atua realizando o *capping* do RNA viral, ao invés de guanililtransferase, que normalmente realizaria este processo nos eucariontes; e por fim MTase (Metiltransferase), responsável por inserir dois grupos metil no RNA viral, nas posições 2' O da ribose do primeiro nucleosídeo do RNAm, e outro no grupo N7 do *cap* de guanosina (97). A conservação destas regiões está

concentrada principalmente na metade da região N-terminal do polipeptídeo de L entre os aminoácidos 422 e 938, incluindo a região conservada III. A região conservada III contém os motivos A-D, (98) incluindo o motivo GDNQ que faz parte do sítio ativo da polimerase.

Para o entendimento do processo de *capping* do HRSV os artigos costumam utilizar o vírus da estomatite vesicular (VSV), que é um protótipo para estudos dos vírus de fita negativa simples e não-segmentados incluindo outros *Mononegavirales*. O processo de *capping* neste vírus acontece de forma diferente de como ocorre normalmente em eucariontes (99). Nos eucariontes a enzima guanililtransferase é responsável por transferir GMP até a porção 5' receptora do RNAm, que após ação enzimática e formação de GDP completa o processo de inserção do *cap*. Nos vírus estudados, a enzima GDP poliribonucleotidiltransferase é a responsável por fazer este processo, porém de forma distinta. Transfere GDP a partir de GTP da porção 5' doadora, e após ação enzimática da polimerase há a ligação covalente a unidade 5' de GMP (unidade receptora), construindo assim uma ligação 5'-5' fosfodiéster e concluindo a formação do *cap* (99). Posteriormente ocorre o processo de metilação através da ação da metiltransferase nas regiões N7 da guanina da extremidade, e 2'O da ribose complementar. O processo de metilação viral também é distinto do celular em dois fatores principais: A ordem de metilação (com as metilases celulares ocorre primeiramente a metilação de N7 da guanina e depois de 2'O da ribose, e esta ordem é invertida na metilação viral); Outro fator é que a polimerase viral possui apenas um sítio receptor para o doador do grupo metil S-adenosilmetionina, diferentemente da metilação celular, na qual cada uma das regiões receptoras possui um sítio doador para cada região receptora do grupo metil (97,98,99).

**Figura 13- A=** Representação da proteína L do HRSV, destacando as funções RdRp (RNA polimerase RNA-dependente); PRNTase (Polirribonucleotidiltransferase); e MTase (Metiltransferase) (100); **B=** Estrutura tridimensional da Proteína L de VSV. (101)



A região extragênica *trailer* é a região extracistrônica do genoma viral, possui 155 nucleotídeos, contém o promotor responsável pela replicação do antígeno, sendo que, esta região na porção 5' é necessária para a replicação. Demonstrou-se

ainda que a presença da região *trailer* na porção 5' do antigenoma, impede a formação de grânulos de estresse, otimizando a replicação do genoma viral. O antigenoma possui a região promotora *TrC*, responsável pela replicação do RNA. Este promotor assim como a região *leader* do genoma viral, possui uma sequência essencial mínima promotora idêntica à da região *leader* de 36 nucleotídeos (102).

A grande extensão da região *TrC* fora da região promotora mínima essencial (36nt) pode estar relacionada com a potencialização do promotor, em comparação com a mesma região de *leader*, visto que já foi demonstrado que em células infectadas pelo HRSV há uma maior quantidade de genomas em detrimento de antigenomas (102).

A região *Tr* também é necessária para garantir a especificidade da encapsidação do genoma, permitindo a montagem seletiva dos virions (103).

Estudos indicam que a região *Tr* também pode estar relacionada com a inibição da formação de grânulos de estresse celular, inibindo conseqüentemente a apoptose (104).

**Tabela 1-** Matriz de interação entre as proteínas do HRSV. As marcações verdes indicam interação já descrita na literatura.

	NS1	NS2	N	P	M	SH	G	F	M2-1	M2-2	L
NS1	■										
NS2		■									
N			■								
P			✓	■							
M					■						
SH						■					
G					✓		■				
F							✓	■			
M2-1			✓	✓	✓				■		
M2-2										■	
L			✓	✓					✓		■

### 1.4 Ciclo Infecioso

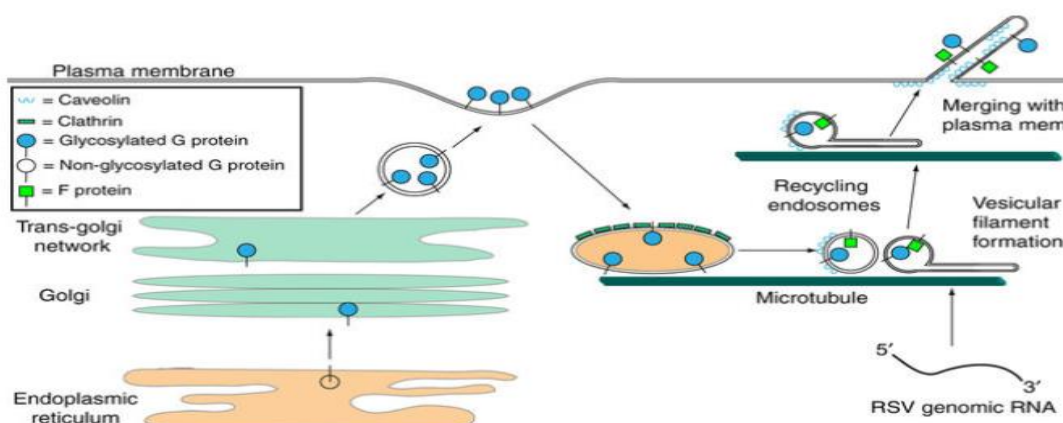
O ciclo infeccioso viral inicia-se com a entrada do mesmo nas células epiteliais ciliadas do aparato respiratório através da região apical destas (105). A entrada é possível primeiramente através da interação da Glicoproteína G com o receptor da célula hospedeira, os receptores de GAGS (Glicosaminoglicanos) das células epiteliais respiratórias. Após a interação da proteína G com os receptores e a adesão do vírus a célula, a glicoproteína F atua ocasionando a fusão do envelope viral a membrana plasmática (106) através do receptor nucleolina (76), possibilitando assim a entrada do vírus na célula, mediada por clatrina em células não imunes (107). A proteína F sofre uma arrojada alteração conformacional, mudando de sua forma de pré-fusão, para a forma de pós-fusão, expondo os peptídeos de fusão que são introduzidos na membrana da célula hospedeira, permitindo a formação de *hairpins* que possibilitam a fusão membranar. Uma vez no interior celular, o nucleocapsídeo helicoidal, constituído por RNA encapsidado pela proteína N é liberado no citoplasma (24,32,41) e associado ao complexo de RNA polimerase RNA-dependente viral, que compreende a subunidade (L) de polimerase, a fosfoproteína (P) e um fator de transcrição, M2-1 (108).

O ciclo infeccioso do HRSV é dividido em duas etapas, sendo elas, a replicação e a transcrição dos RNAs subgenômicos (109,110). Tanto a replicação do antigenoma como do genoma é acompanhado por uma encapsidação concomitante pela proteína N, e a síntese do RNA é alterada da transcrição para replicação quando há proteína N suficiente acumulada para encapsidar o RNA recentemente gerado (38,111). Isto resulta na síntese do antigenoma, que permite que a polimerase atue no modo anti-terminação (90,91). Durante a transcrição a polimerase é guiada pelos sinais GS que sinalizam o início do processo transcricional codificando o terminal 5' da fita de RNAm enquanto o sinal GE sinaliza a terminação da transcrição, e conseqüentemente a poliadenilação, codificando o terminal 3' da fita do transcrito final (28,103,111.).

Para executar a transcrição a polimerase inicia pela posição +3 do promotor *leader* na porção 3' do genoma. Isto resulta na síntese de uma fita de RNA curta de 20 a 30 nucleotídeos de extensão, o qual atua como iniciador para a polimerase, até que ela atinja o nucleotídeo 45, reconheça o sinal de início do primeiro gene (NS1) e proceda a transcrição (112). As glicoproteínas de superfície são sintetizadas no RE e

glicosiladas no complexo de Golgi, são transportadas e acomodadas em regiões específicas da membrana (balsas lipídicas) e após a interação com a proteína M, através de suas caudas citoplasmáticas o virion está pronto para ser liberado (112). Gower e colaboradores mostraram que neste momento há uma indução da sinalização de Rhoa, uma GTPase responsável pela alteração do citoesqueleto celular. Isto resulta na liberação de formas filamentosas de virions que como foi demonstrado são mais propensos a formar sincícios nas células vizinhas (113). Porém um estudo posterior realizado por Shaikh e colaboradores mostraram que a liberação da forma filamentosa é independente das proteínas do citoesqueleto, estando mais relacionado á ações diretas de proteínas virais (114). A formação destes filamentos requer as proteínas F, N, P e M e já foram relacionados á uma maior titulação viral, por consequência de uma maior distribuição entre as células vizinhas (23). Um trabalho recente realizado por Vanover e colaboradores demonstrou que a formação do filamento acontece antes da membrana plasmática, como representado abaixo, uma distensão das vesículas ao longo dos microtúbulos é responsável pela formação destas vesículas. Após a tradução da proteína G da progênie no RE, a glicosilação e o transporte através das redes do complexo de Golgi até a membrana, a proteína G entra em um processo de reciclagem pelo endossomo em um processo de endocitose mediado por vesículas de clatrina que possuem também a proteína F em seu interior. Através da ação de dineínas estas vesículas são distendidas ao longo dos microtúbulos, formando partículas filamentosas antes de serem carregadas pelo RNA genômico do HRSV. Posteriormente e através da ação de caveolinas os filamentos amadurecem e unem-se á membrana em um processo ainda desconhecido (115).

**Figura 14** - Processo de formação das formas filamentosas (115)

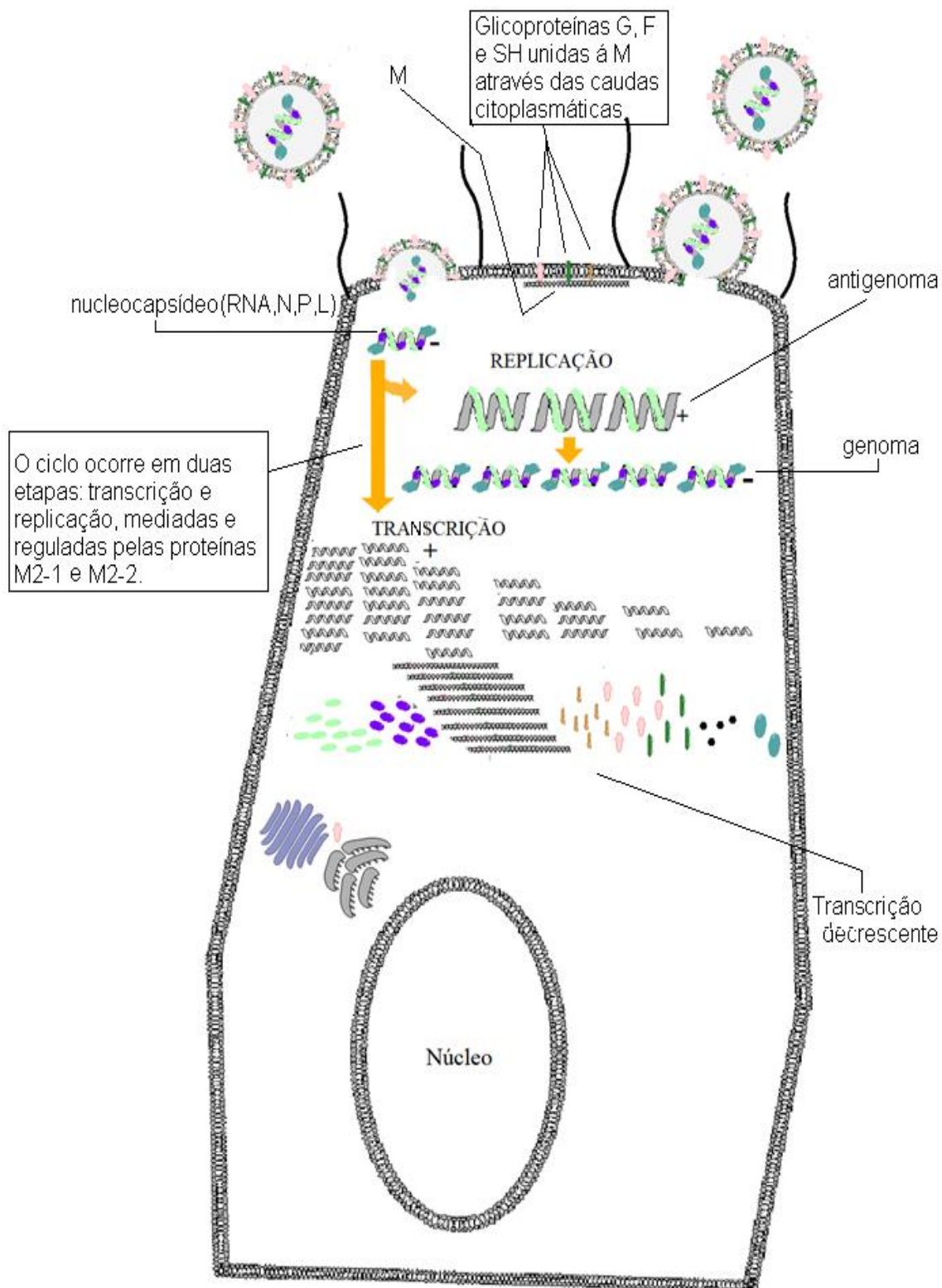


Outros fatores que influenciam no processo de fusão e formação dos sincícios ainda precisam ser esclarecidos. Sabe-se que mutações nos domínios de repetição heptada A (HRA) em metapneumovírus, (um vírus respiratório mais próximo do RSV) alteram as características de fusogenicidade da proteína e a sua capacidade de formar sincícios (116). O processo de liberação viral também ocorre no domínio apical da célula infectada (105).

O processo de interação entre o HRSV e o hospedeiro tem sido estudado arduamente e vem nos mostrando características importantíssimas do patógeno. Como resultado destes estudos podemos destacar algumas destas características. Li e colaboradores demonstraram que o HRSV é capaz de bloquear o processo de apoptose celular através da indução de autofagia, mais especificamente mitofagia, diminuindo a liberação de citocromo C, bem como a indução de apoptose (117).



**Figura 15-** Ciclo infeccioso do HRSV



Fonte: O próprio autor, data

### 1.5 Etiologia

A infecção pelo HRSV tem característica sazonal, tipicamente se apresentando como uma infecção do trato respiratório superior, podendo provocar bronquiolite e pneumonia em pacientes susceptíveis. Os sintomas costumam aparecer dentro de 4 a 6 dias após a infecção, e estes pacientes recuperam-se num prazo de 7 á 14 dias, podendo, no entanto, ainda disseminar o vírus até 3 semanas após a infecção.

A infecção nosocomial por HRSV já foi associada a maior mortalidade do que a infecção adquirida na comunidade graças aos fatores de morbidade presentes (118,119). As crianças com idade de até 2 anos quase que em sua totalidade serão infectadas pelo HRSV. Um estudo realizado por Krilov e colaboradores em 2011 destacou que a infecção pelo HRSV é responsável por 160,000 a 600,000 mortes por ano só nos EUA (120). Aproximadamente 25% a 40% dos lactentes e crianças, na primeira exposição ao HRSV, apresentam sinais ou sintomas de bronquiolite ou pneumonia (121). Estes sintomas incluem rinorréia, febre baixa, tosse e sibilância e em adultos podem incluir resfriado comum, com rinorréia, dor de garganta, tosse, mal-estar, dor de cabeça e febre (121,122). Também pode levar a sintomas exacerbados, como a pneumonia grave em idosos, especialmente residentes em residências de idosos e é importante salientar também que os índices de mortalidade e hospitalizações ocasionados pelo HRSV vêm crescendo na população idosa (122). Entre a população com maior risco de desenvolver infecção respiratória grave pode-se destacar crianças prematuras, com doença pulmonar crônica e cardiopatas.

A infecção por HRSV pode ser dividida em 2 estágios, o prematuro e o tardio, sendo que, no primeiro estágio há distribuição do vírus pelo sistema respiratório superior, e o segundo estágio, no qual o vírus migra até o sistema respiratório inferior, mais precisamente nos bronquíolos, onde causa inflamação do epitélio dos mesmos, ocasionando a liberação de uma camada de muco, e camada de células mortas no interior dos alvéolos, que resultam nos sintomas típicos de bronquiolite, como falta de ar, tosse ,sibilância, hipóxia, e letargia, estes dois últimos ocasionados pela diminuição da oxidação sanguínea e gasto energético para suprir esta carência (124). Estudos mostram que, recém-nascidos e crianças que sofreram infecção grave pelo HRSV são mais susceptíveis a desenvolverem complicações respiratórias futuras, como por exemplo asma (125).

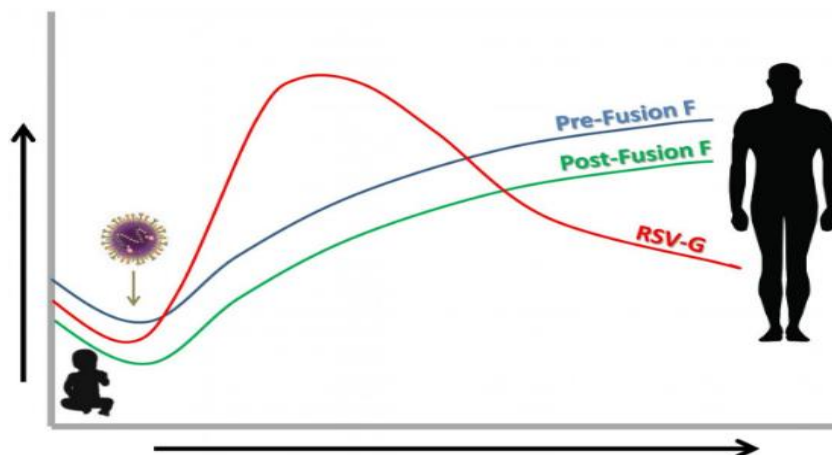
O HRSV é causador de até 75% dos casos de bronquiolite, e 40% das pneumonias durante o período de sazonalidade (126). Entre outros vírus causadores da patologia, podemos destacar o metapneumovírus humano (MPV), o adenovirus e o virus parainfluenza (121).

### 1.5.1 Resposta Imunológica ao HRSV

Como já elucidado as duas proteínas com papéis antigênicos F e G são aquelas que induzem respostas imunológicas nos hospedeiros. Estudos que objetivaram a resposta imunológica ao HRSV demonstraram algumas características interativas destas proteínas em distintas fases de vida dos seus hospedeiros.

Ao nascer os anticorpos maternos são transferidos ao recém-nascido e lhe fornecem uma modesta defesa contra o HRSV pelo menos até os primeiros 9 meses de idade, quando o título de anticorpos maternos começa a diminuir e entre este período até os 2 anos de idade sua susceptibilidade de adquirir a infecção aumenta. Os anticorpos contra a proteína G e F são produzidas ao primeiro contato com o HRSV em grande quantidade (F e G) e diversidade (G), porém há uma clara diminuição das respostas imunológicas desta última ao longo do tempo. Isto se deve á grande variação desta proteína entre as diversas estipes virais existentes, superando o processo evolutivo dos anticorpos. Já a defesa imunológica contra a proteína F mostrou se elevar ao longo do tempo pois a mesma demonstra uma clara conservação entre os isolados (127,128).

**Figura 16-** Evolução da resposta de anticorpos humanos à infecção por HRSV das 2 principais proteínas de superfície (127)



Fonte Ketaki Singh, USP

### *1.6 Sazonalidade*

A sazonalidade do HRSV é bem conhecida nos dois hemisférios. No hemisfério Sul a sazonalidade inicia no mês de maio e estende-se até setembro (126), podendo haver uma pequena variação como por exemplo, em alguns anos surtos iniciando no final de fevereiro e findando em meados de agosto. Em resumo a sazonalidade costuma abranger o período do Outono e o Inverno, durando de 4 a 6 meses, dependendo das características de cada país ou região (126,127,129), podendo até mesmo dentro de próprio país, ter padrões de circulação distintos. Por exemplo, alguns dados brasileiros apontam que os meses de abril e maio são os meses com os maiores picos da doença, nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste (126).

### *1.7. Diagnóstico clínico*

Por ser uma infecção com alta taxa de internação o diagnóstico clínico para o HRSV precisa ser rápido, sensível e específico, haja visto que seus sintomas são muito similares a de outras infecções agudas do trato respiratório. O diagnóstico clínico do HRSV pode ser realizado por exames diretos com pesquisa em aspirado de nasofaringe, swab nasofaríngeo e lavagem nasal, Imunofluorescência e PCR. Além de exames indiretos, através da sorologia de IgG e IgM por meio de ELISA e imunofluorescência, Western blot além da detecção por meio cultura de células (130,131). Alguns testes rápidos também foram desenvolvidos utilizando como alvo principalmente a proteína de fusão do HRSV (131). Trabalhos anteriores comparando alguns das técnicas de coleta de amostras clínicas diretas mostraram que a eficiência diagnóstica também depende da qualidade do espécime clínico. Por exemplo o aspirado de nasofaringe e o lavado nasal se mostraram mais sensíveis para a detecção do HRSV em isolamento viral e PCR em tempo real (132), apesar do esfregaço nasal ser mais comumente utilizado devido a sua facilidade.

## 1.8 Tratamento

### 1.8.1. Perspectivas futuras

O sucesso no desenvolvimento de uma vacina eficiente contra o HRSV encontra diversas barreiras impostas pelo vírus. Dentre elas podemos destacar a alta variação genica e antigênica entre os subtipos e os genótipos, a forma como as proteínas do HRSV burlam o sistema imunológico do hospedeiro (9, 133) e a diminuição acentuada de anticorpo séricos já no primeiro ano após o contato com o vírus (134). Os altos custos proporcionados pelo uso de anticorpos monoclonais humanizados, como o palivizumabe também potencializam a importância do desenvolvimento de um tratamento de baixo custo e eficiente (135).

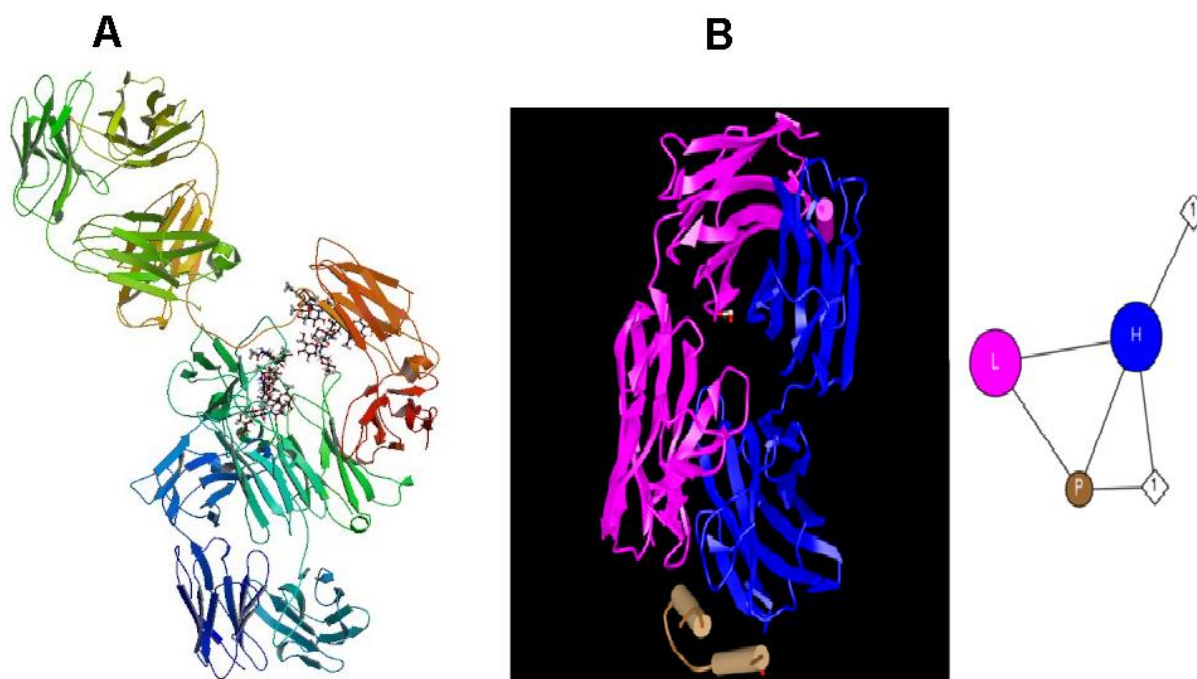
Atualmente não há vacina disponível contra o HRSV, embora hajam grandes esforços para o seu desenvolvimento, mas como citado acima, muitos fatores prejudicam o sucesso destes estudos. Uma vacina inativa com formalina foi testada em 1967, porém a mesma conduziu a uma infecção mais severa, quando os pacientes entraram em contato com o vírus selvagem (136,137).

O bRSV está sendo utilizado como modelo para o desenvolvimento de inibidores de fusão do vírus humano (138).

As proteínas de superfície viral são as mais apropriadas para o desenvolvimento e melhoria de tratamentos imunoproláticos através da utilização de anticorpos monoclonais humanizados, como o palivizumabe, que foi o único anticorpo aprovado como medicamento pela FDA em 1998 e direcionado para crianças prematuras e com problemas respiratórios crônicos, atuando como um inibidor da fusão viral às células do epitélio respiratório, através da sua ligação com a proteína F (150).

O motavizumabe um anticorpo monoclonal de segunda geração derivado do palivizumabe, e diferindo deste último em 13 resíduos de aminoácidos (sendo 7 destes responsáveis pelo aumento da afinidade pelo sítio antigênico) e sendo dez vezes mais potente que o primeiro (139). Assim como o palivizumabe o sítio antigênico A é o local de ligação deste anticorpo (140).

**Figura 17**-A-Estrutura do palivizumabe; (141) B-Estrutura do Motavizumabe ligado ao epítipo do sítio A da proteína F de HRSV. L=Light Chain; H=Heavy Chain; P= Proteína F. (142).



Os trabalhos envolvendo agentes imunoproliféricos ainda estão em constante estudo, e se encaminham para o desenvolvimento de mABs de terceira geração como por exemplo o MEDI-557 (MEDI-524-YTE), da MedImmune que possui meia vida estendida e é um derivado do motavizumabe (143).

Uma nova classe de proteínas terapêuticas também tem obtido destaque nos estudos de novos fármacos contra o HRSV. Trata-se dos nanocorpos que são anticorpos modificados, contendo apenas uma porção das suas cadeias pesadas e sem as cadeias leves. Estes nanocorpos tem algumas vantagens já descritas, em comparação ao mABs, como por exemplo múltiplas rotas de administração, tamanho, robustez etc. Um dos representantes desta classe é o ALX-0171, um nanocorpo trimérico que se liga ao sítio antigênico II (ou A) da proteína de fusão do HRSV com uma afinidade subnanomolar, demonstrando neutralização superior a do palivizumabe in vitro (144).

O uso de peptídeos grampeados também demonstrou ser uma alternativa eficaz segundo o trabalho de Gaillard e colaboradores em 2016. Estes são peptídeos sintéticos que são derivados da região de sequência heptada (HR). Este peptídeo duplamente grampeado atua ligando-se a região heptada, impedindo a formação do complexo de 6 hélices (6HB), que é necessário para o processo de fusão exercido pela proteína F (145).

Ao longo dos anos os estudos para o desenvolvimento de um tratamento eficaz e a melhor compreensão dos processos de interação viral com o hospedeiro tem se intensificado. O desenvolvimento em imunização passiva tem se mostrado mais eficaz que a imunização ativa, por diversos fatores imunológicos e evolutivos (146). Neste contexto, as Glicoproteínas G e F que são os alvos de anticorpos neutralizantes continuam sendo de fato as proteínas de interesse (147). A Proteína G possui entre outras características sua variabilidade de sequência fora do domínio central conservado, e de sítios de glicosilação que dificultam a sua utilização como antígeno vacinal (148). Fedechkin e colaboradores descreveram a interação entre anticorpos amplamente neutralizantes e a região central conservada (CCD) da glicoproteína G de HRSV, e sugeriu que esta ligação poderia bloquear a atividade de CCD de ativar os receptores de quimiocina CX3CR1 (148).

Atualmente o mAB MEDI8897 que está na em fase de teste clínico II está sendo desenvolvido em conjunto pela Sanofi-Pasteur e AstraZeneca, promete ser um tratamento imunoprolático passivo de meia vida estendida e que poderá durar toda a estação de HRSV (143).

**Tabela 2-** Principais classes de agentes utilizados e ou em estudo para o tratamento/profilaxia do HRSV presentes na literatura.

<b>Alvo terapêutico</b>	<b>Descrição</b>	<b>Modo de atuação</b>	<b>Referência</b>
Proteína N	<b><u>RSV604</u></b>	Inibição da formação do nucleocapsídeo	Challa et al 2015 (149) HRSV
Proteína F	<b><u>Palivizumabe</u></b> =Anticorpo monoclonal	Inibição da fusão por ligação ao alvo	Group study 1998 (150)
Proteína F	<b><u>Motavizumabe</u></b> =Anticorpo Monoclonal	Inibição da fusão por ligação ao alvo	Cingoz 2009(140)
Proteína F	<b><u>Peptídeos Duplamente Grampeados</u></b> = 4ca	Inibição da formação do complexo de 6 hélices (fold 6HB)	Gaillard et al 2017 (145)
Proteína F	<b><u>Nanocorpos</u></b>	Inibição da fusão por ligação ao alvo	Detalle et al 2016 (144)
Polimerase	<b><u>Análogos de Nucleosídeos</u></b>	Inibidores da Polimerase	Fearn et al 2016 (151)

## 2. Justificativa

A região de atuação do palivizumabe compreende um epítopo no sítio antigênico A, também chamado de sítio antigênico II que compreende dos aminoácidos 262 a 276 da proteína de fusão do HRSV. Este possui um fold hélice-loop-hélice que se liga a determinados anticorpos monoclonais como o palivizumabe. Esta região vem sendo alvo de diversos estudos para o desenvolvimento de vacinas contra o HRSV, por ser uma região relativamente conservada e estar presente em ambas as conformações da proteína F (pré e pós-fusão). Mutações dentro desta região podem ocasionar o surgimento de MARMs ao passo que mutações fora do sítio A não demonstraram, até então, ter influência em uma possível resistência aos mABs.

O palivizumabe é atualmente o único medicamento profilático efetivo contra o HRSV, por isso estudos no monitoramento do surgimento de possíveis mutantes de escape para este mAB, bem como o padrão de distribuição desta mutação e de outras características evolutivas da proteína de fusão entre as populações virais é de extrema importância.



### 3. Objetivos

Realizar o monitoramento genotípico do Vírus Respiratório Sincicial Humano estudando as mudanças evolutivas na proteína F, porção parcial F1 do HRSV particularmente mutações de potencial de resistência no epítipo de ligação do palivizumabe (aminoácido 262-276), de cepas oriundas de crianças atendidas no Departamento de Pediatria e Puericultura da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP) durante o período de março de 2008 a setembro de 2010 e que não fizeram uso do PZV.

Destacar o padrão de introdução de possíveis mutações no sitio A da proteína de Fusão do HRSV nestas amostras, bem como realizar uma análise *in silico* para identificar como a proteína de fusão reage estrutural e funcionalmente as mutações dentro da região de atuação do palivizumabe.

## 4. Material e métodos

### 4.1 Histórico das sequências analisadas

No período de 1 de março de 2008 a 30 de setembro de 2010 foram coletadas 1113 amostras de secreção nasofaríngea de crianças menores de 24 meses com doença respiratória aguda internados no Departamento de Pediatria e Puericultura da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP). Estas amostras são provenientes de um estudo de vigilância de Infecção do Trato Respiratório realizado em conjunto com o Instituto de Ciências Biomédicas da USP intitulado “Vírus Respiratórios: Características clínicas, epidemiológicas e moleculares em crianças com infecção respiratória aguda”, sendo este projeto aprovado em ambos os comitês de ética em pesquisa (Santa Casa e Instituto de Ciências Biomédicas-USP).

Após a realização de PCR multiplex para 8 vírus respiratórios distintos (metapneumovírus humano, adenovírus, vírus sincicial respiratório humano, parainfluenza 1,2 e 3, e Influenza A e B, 809 amostras do total coletado apresentaram resultado positivo para algum vírus respiratório estudado e 283 (35%) das amostras foram positivas para Vírus Respiratório Sincicial Humano.

### 4.2 Montagem e Edição das sequências

A montagem e análise dos 400 contigs disponíveis foi realizada utilizando o Software SEQMAN II v.5.03 (DNASTar, Madison, WI, USA) (156). Durante a edição das sequências, os contigs que apresentaram baixa qualidade (SeqMan Pro Quality Score <20 com cobertura igual ou, maior que 92% do contig) foram excluídos (n=88), e após a montagem, obtiveram-se 223 sequências com uma média de 800 nucleotídeos de extensão. As mesmas foram convertidas para o formato fasta para melhor visualização com o software de visualização Aliview (157) onde foram alinhadas por meio do programa Muscle (158).

As sequências foram então aparadas até atingirem 767 nucleotídeos, abrangendo assim o gene da posição 619 até 1429 tendo a cobertura do aminoácido 214 ao 476 (262 aminoácidos). Esta cobertura pôde ser representada sequencialmente com a utilização da ferramenta web AGA v.0.91 presente no website <https://www.ge->

nomedetective.com (159,160), e estruturalmente com o auxílio do software UCSF Chimera v.1.12rc (161). Isto foi possível utilizando duas sequências consenso do alinhamento inicial das 223 sequências (um para cada subtipo). Estas duas sequências consenso foram comparadas com duas outras sequências de referência para HRSVA e HRSVB presentes no banco de dados do RefSeq (162) *NC\_038235.1/NC\_001781.1*. No alinhamento estrutural foi utilizada a proteína na sua forma de pós-fusão com o identificador do PDB 3RRR (163), disponível no banco de dados do PDB (164) disponível em <https://www.rcsb.org/structure/3RRR>.

Em alguns casos foi necessário converter algumas destas sequências para os seus respectivos reversos complementos com a utilização da ferramenta de edição presente do visualizador Aliview. Algumas sequências foram excluídas da análise por não cobrirem a região de interesse (BR2008\_Sta11\_GA2; BR2008\_Sta47\_GA5; BR2010\_Sta904\_BA9), e outras 10 por possuírem lacunas muito extensas e/ou muitos ruídos de sequenciamento.

#### *4.3 Coleta das Sequências do Banco de dados do Genbank/Genotipagem e exclusão de redundância*

As 210 sequências restantes (101 do subtipo A e 109 do subtipo B), foram submetidas a genotipagem através de análise filogenética com o programa MegAlign v.5.03 (DNASar, Madison, WI, USA); (165), utilizando o método Clustal W (166) para o alinhamento, e o algoritmo de *neighbor Joining* para gerar a árvore (167).

Uma sequência de HRSV bovino (*AF295544.1*) foi utilizada como grupo externo (*outgroup*), além de análise de identidade, para exclusão de redundância, utilizando o Software MEGA 7 (168), através da análise de estimativa de distância aos pares, utilizando o bootstrap como o método de estimação de variância em um total de 1000 réplicas, considerando o número de diferenças de nucleotídeos entre os pares, que incluíam as transições + tranversões com taxas uniformes. A ferramenta de colapsar presente no software UGENE (169) auxiliou neste procedimento. Este processo resultou em 127 sequências que foram aleatoriamente escolhidas como representativas (77 sequências do subtipo A e 50 do subtipo B). Como o foco principal deste trabalho foi o sítio A, realizou-se também uma redução de redundância nas sequências dentro desta região, o que trouxe um resultado final de 8 regiões (3 de HRSVA e 5 de HRSVB)

distintas sendo as mesmas representativas finais da região. Durante este trabalho estas últimas foram tratadas como representativas do sítio A, enquanto que as 127 sequências parciais da proteína F foram tratadas como representativas parciais. Todas as análises deste trabalho tiveram como foco principal a região do sítio A, sendo que as análises que foram realizadas para as representativas parciais ocasionalmente também foram realizadas para as representativas do sítio A.

As representativas parciais foram comparadas com 1830 sequências (1279 do subtipo A e 551 do subtipo B) de diversos países do mundo disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de Informações de Biotecnologia (NCBI) que correspondiam ao período de 1977 até julho de 2018 (170).

#### *4.4 Análises Evolutivas Moleculares*

##### 4.4.1 Distância Evolutiva e Análise de Polimorfismos

As análises de distância evolutiva, com o intuito de verificar a variabilidade do conjunto de dados foram representadas com o auxílio do software SSE v.1.3 (171), utilizando a distância-p como parâmetro métrico entre os pares de sequências por região e total.

A análise dos polimorfismos foi realizada com o auxílio da ferramenta DNAsp 6 (172), com o intuito de identificar SNPs que divergem entre os subtipos, de outras possíveis mutações nestas sequências. As análises comparativas com as sequências do banco de dados auxiliaram neste processo. Foi realizado em concomitância uma análise para avaliar a presença de indels.

##### 4.4.2 Análise de Pressão Seletiva

A análise de substituições sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) foi realizada com a utilização do pacote de softwares de código aberto HyPhy (173,174) presente no servidor Datamonkey disponível no endereço <http://www.datamonkey.org> (175) utilizando a ferramenta FUBAR (176) que detecta possíveis eventos pervasivos de pressão seletiva por local nas sequências analisadas com a probabilidade posterior de 0,99 utilizando 51 sequências para o subtipo A e 46 sequências para o subtipo B.

A ferramenta FEL (174) também disponível no servidor Datamonkey foi utilizada para predição da taxa dN/dS total de HRSVA e HRSVB sob o critério de variação de taxas sinônimas. Ao total foram 256 sítios para HRSVA e 269 sítios para HRSVB.

#### 4.4.3 Predição de sítios de Glicosilação

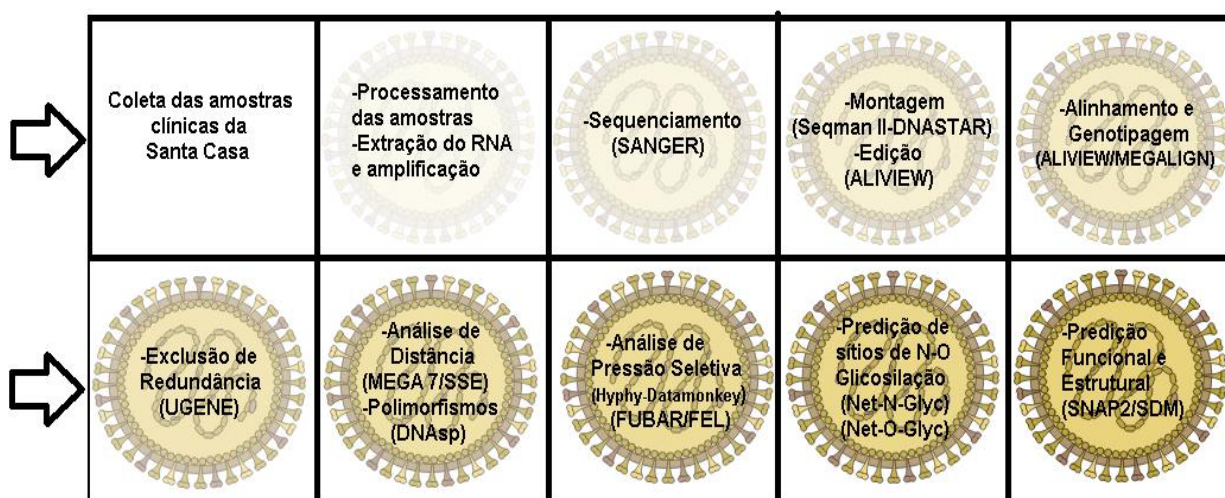
Os possíveis sítios de glicosilação foram preditos utilizando servidores NetOGlyc disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> e NetNGlyc disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> respectivamente (177,178,179,180). O programa Modpred foi utilizado para efeito de comparativo (181).

#### 4.5 Predição de possíveis efeitos funcionais e estruturais das mutações

Com o intuito de verificar quais os possíveis efeitos estruturais e funcionais das mutações presentes dentro da região de atuação do palivizumabe, descritas na literatura e presentes nas sequências da Santa Casa, duas análises in silico distintas foram realizadas, com a utilização dos softwares online SDM (182,183) que prediz alterações na estabilidade da proteína ocasionadas por mutações não-sinônimas. O programa necessita de uma proteína com estrutura já resolvida e presente nos principais bancos de dados proteicos como o PDB. O código identificador da proteína utilizada foi 3RRR (163) disponível no banco de dados do PDB (<https://www.rcsb.org/structure/3RRR>).

Para a predição funcional foi utilizada a ferramenta SNAP2 disponível no website <https://roslab.org/owiki/index.php/Snap2> (184)

**Figura 18-** Fluxo de trabalho



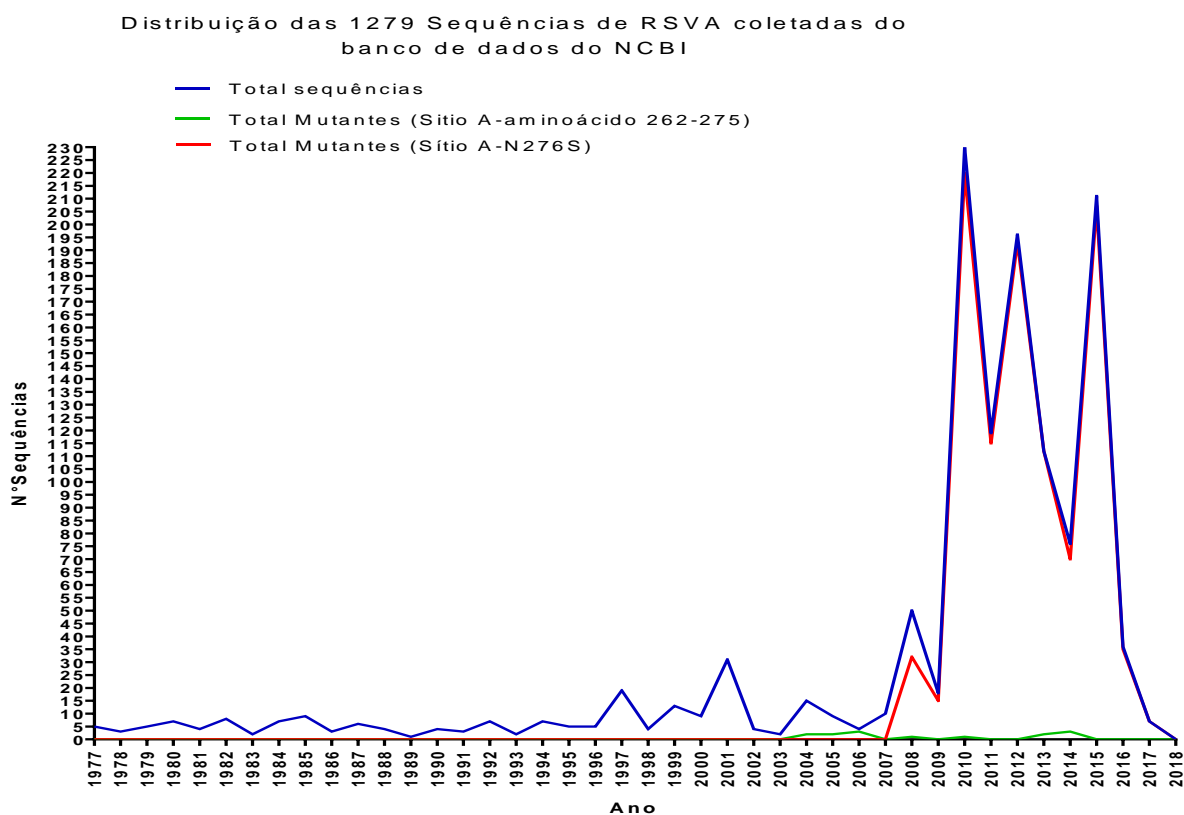
## 5. Resultados

### 5.1 Análise da frequência de mutações da proteína F no Banco de dados do NCBI

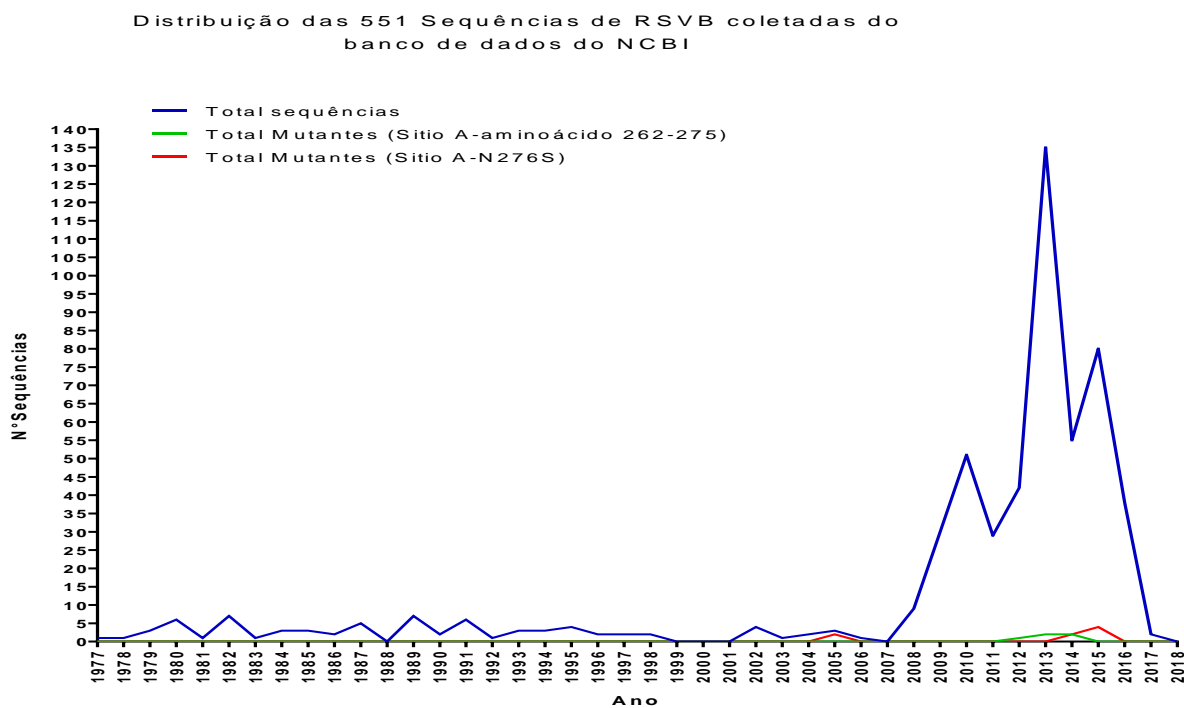
A análise comparativa das sequências analisadas com as do banco de dados auxiliou não apenas na genotipagem das amostras da Santa Casa, como no alinhamento das mesmas, utilizando os protótipos de HRSVA e HRSVB para seguir e ajustar corretamente o *frameshift* dos códons correspondentes. Além disto, a utilização destas sequências do banco de dados do NCBI como fator comparativo forneceu as características que de acordo com a literatura teriam ou não caráter evolutivo, presentes na proteína estudada, com atenção direcionada ao sítio de atuação do palivizumabe. Em suma estas sequências auxiliaram na observação dos padrões de evolução da proteína F do HRSV ao longo dos anos, e o principal intuito foi o de encontrar a frequência média das mutações dentro desta região e quanto a sua disponibilidade neste banco de dados, servindo como um guia para identificar possíveis erros no processo de sequenciamento, haja visto que o nível de conservação desta proteína se mostrou bastante elevado.

O padrão da distribuição da mutação N276S é claramente crescente ao longo dos anos nas sequências do *GenBank*, acompanhando o número total de sequências submetidas no banco de dados. A mutação possivelmente foi fixada no subtipo A, e, embora também ocorra a mutação na mesma posição para o subtipo B (S276N), esta ocorre com uma frequência extremamante baixa, como podemos verificar nos gráficos 1 e 2.

**Gráfico 1-** Padrão de distribuição das mutações no banco de dados ao longo dos anos dentro do sítio A, e na posição do aminoácido 276 da proteína F em HRSVA.



**Gráfico 2-** Padrão de distribuição das mutações no banco de dados ao longo dos anos dentro do sítio A, e na posição do aminoácido 276 da proteína F em HRSVB.

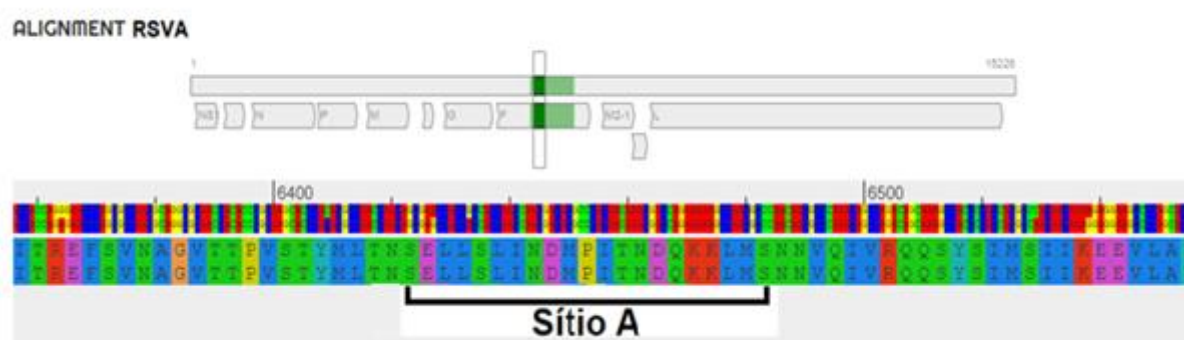


## 5.2 Representação da cobertura das sequências

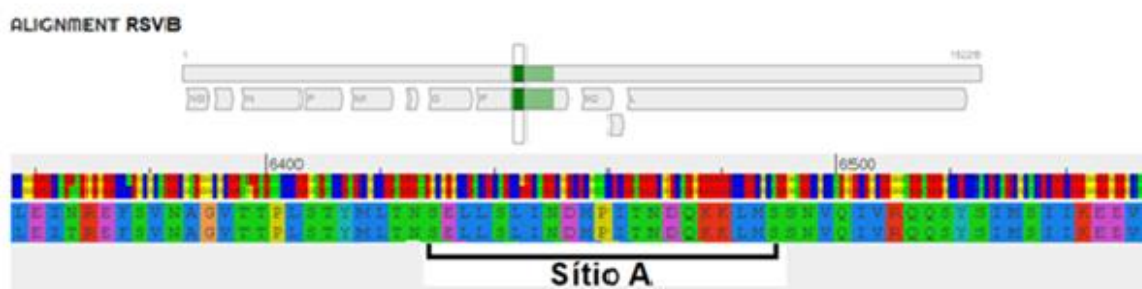
Após os processos de edição, montagem, conversão, alinhamento e aparagem, a cobertura das sequências representativas parciais está representada na figura 19, enquanto a cobertura estrutural pode ser visualizada na figura 20.

**Figura 19-** Cobertura sequencial das representativas parciais de HRSVA e HRSVB alinhadas com as suas respectivas sequências de referência. A) Alinhamento HRSVA; B) Alinhamento HRSVB. A porção em verde destaca a região de cobertura das sequências representativas parciais. Destaque para o Sítio A

A)



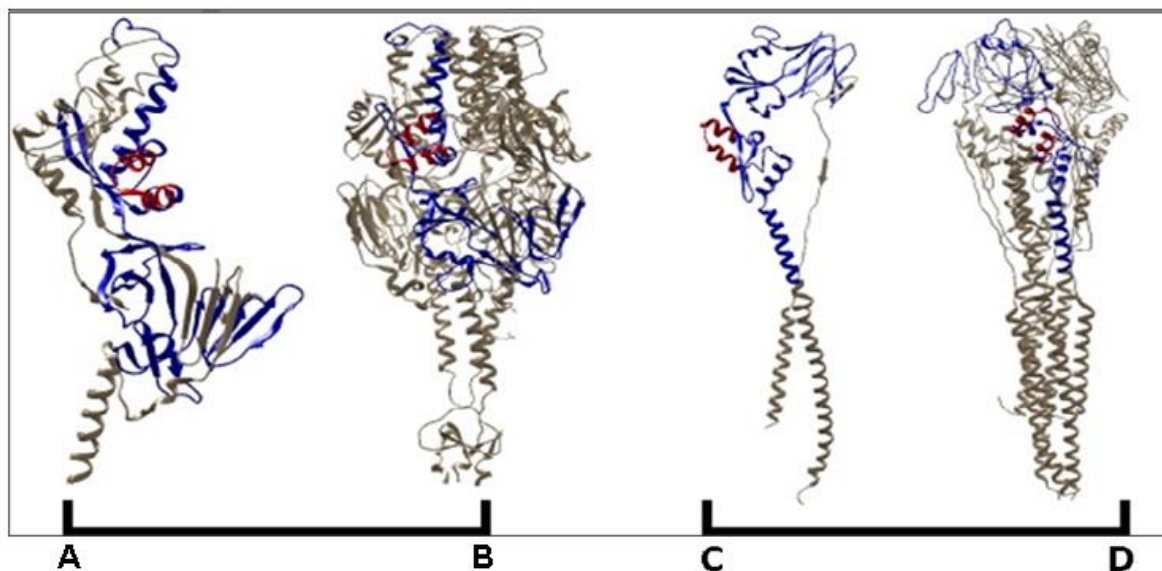
B)



**Figura 20-** A / B =Estrutura 3D da proteína F na conformação de pré-fusão em suas formas de monômero e trímero respectivamente; C/D= Estrutura 3D da proteína F na conformação de pós-fusão em



suas formas de monômero e trímero respectivamente; as regiões em azul das estruturas 3D das proteínas F mostram cobertura das sequências da Santa Casa e as vermelhas mostram a localização do sítio A.



### 5.3 Exclusão da redundância/ genotipagem

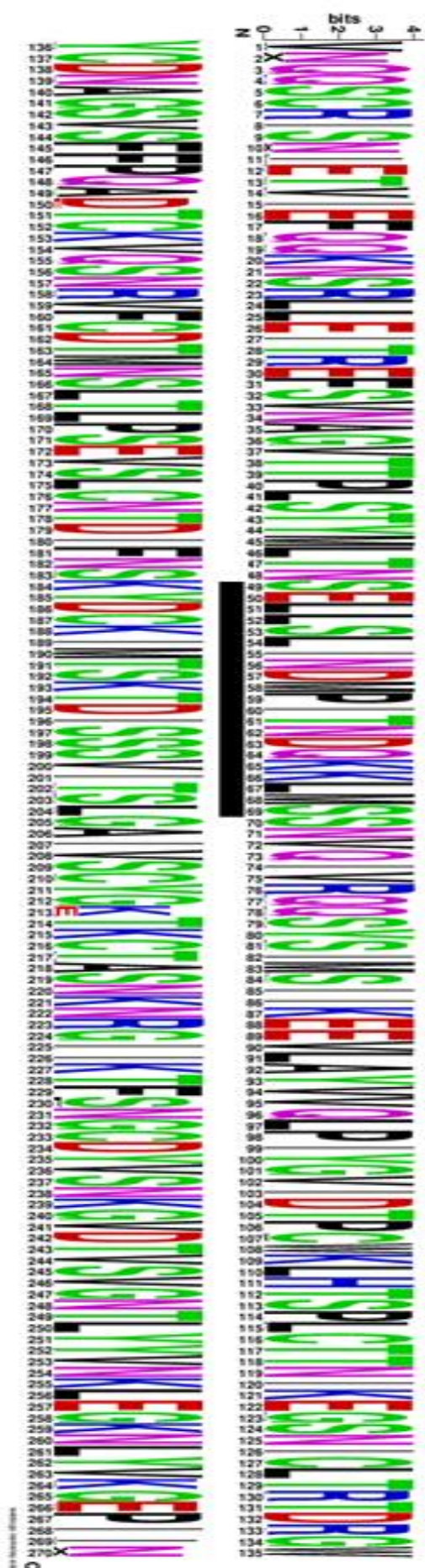
As etapas de exclusão de redundância estão representadas no apêndice A. A mesma resultou em um conjunto de dados bastante reduzido, por causa do alto grau de similaridade entre as sequências (ver seção 5.4.1).

A genotipagem realizada com o software Megalign evidenciou uma co-circulação entre os dois subtipos de HRSV nas 3 estações sazonais. No ano de 2008 o subtipo A prevaleceu, enquanto que no ano de 2009 o subtipo B prevaleceu. Neste ano foi inserida a mutação N276S no genótipo NA1 com uma população pequena destes mutantes. No ano de 2010 podemos observar um maior equilíbrio na presença dos subtipos e a mutação prevalece no genótipo NA1 no último ano estudado.

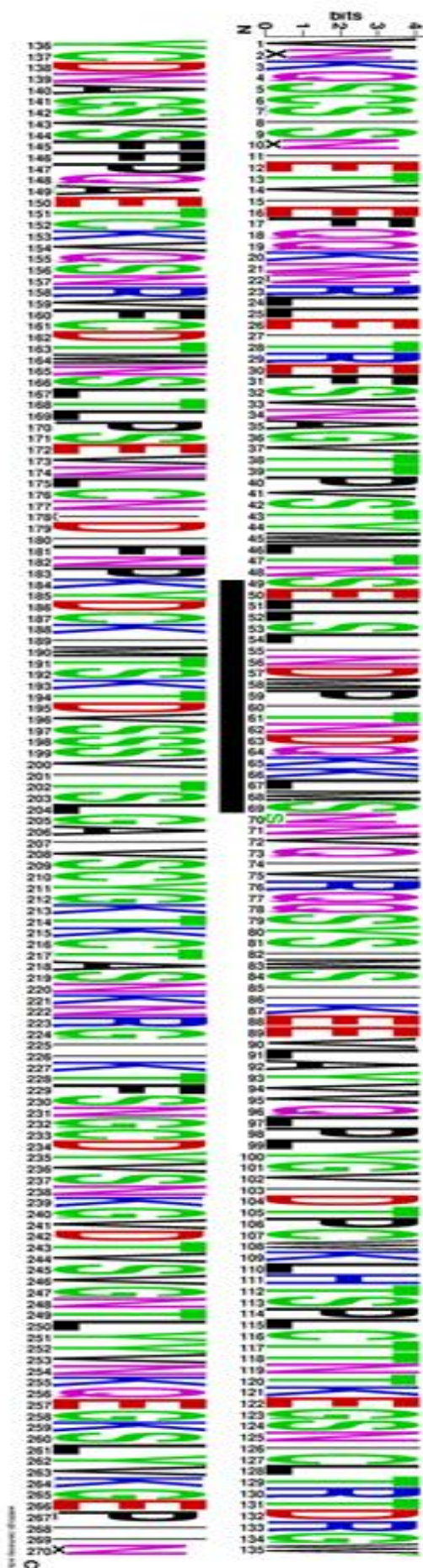
**Figura 21-** Alinhamento de nucleotídeos das sequências representativas do sítio A. Na página 63 podemos visualizar o alinhamento de aminoácidos das representativas parciais de HRSVA e HRSVB representadas com a utilização da ferramenta Weblogo disponível em <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (185) Sítio A em destaque (barra escura).

Representativas Sítio A	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42																					
BR2008_Sta112_GA5	A	A	T	G	A	T	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C		
BR2008_Sta176_GA2	A	A	T	G	A	T	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	A	T	T	A	A	T	G	T	C	C		
BR2008_Sta140_BA9	A	A	T	G	A	T	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	A	T	T	A	A	T	G	T	C	A		
BR2009_Sta456_GB13	A	A	T	G	A	T	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	A	T	T	A	A	T	G	T	C	G		
BR2009_Sta465_BA10	A	A	T	G	A	T	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	G	A	A	T	T	A	A	T	G	T	C	A
BR2009_Sta515_BA10	A	A	T	G	A	C	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	A	T	T	A	A	T	G	T	C	A		
BR2009_Sta628_GB13	A	A	T	G	A	C	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	A		
BR2010_Sta813_GA2	A	A	T	G	A	T	A	T	G	C	C	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	T		

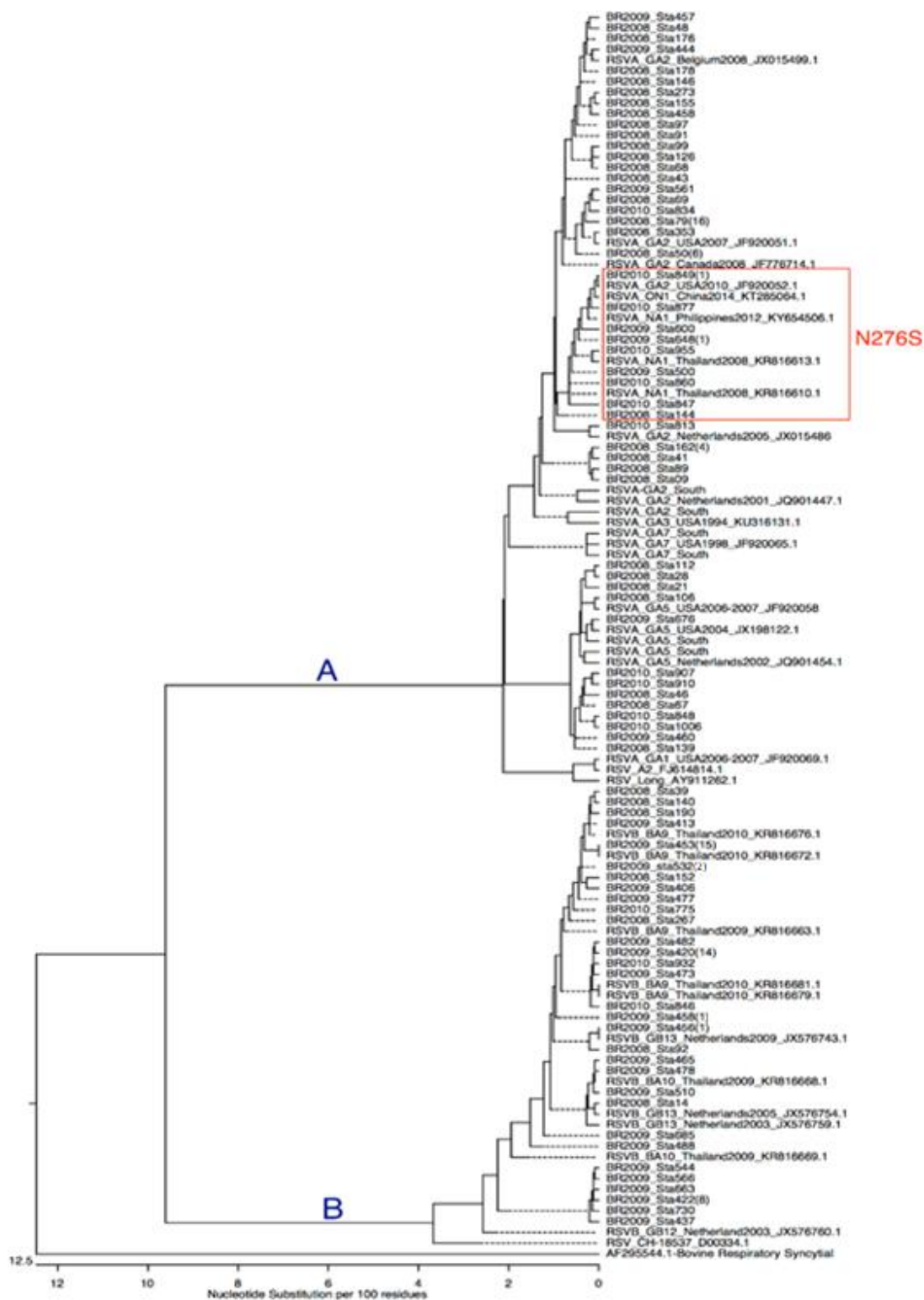
## RSVB



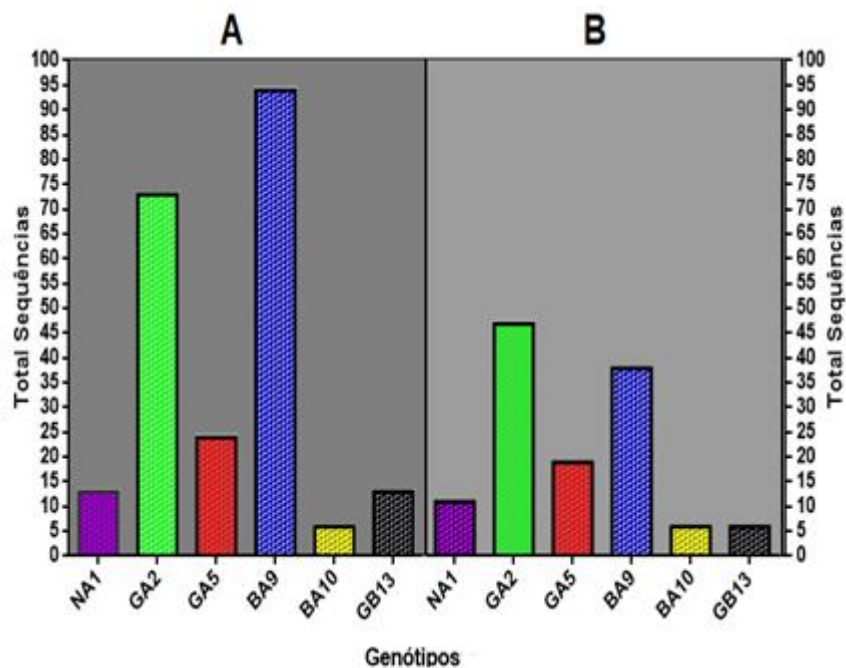
## RSVA



**Figura 22-** Árvore filogenética das sequências representativas parciais com representantes dos genótipos retirados do banco de dados do NCBI. Em destaque a mutação N276S. A=HRSVA e B=HRSVB

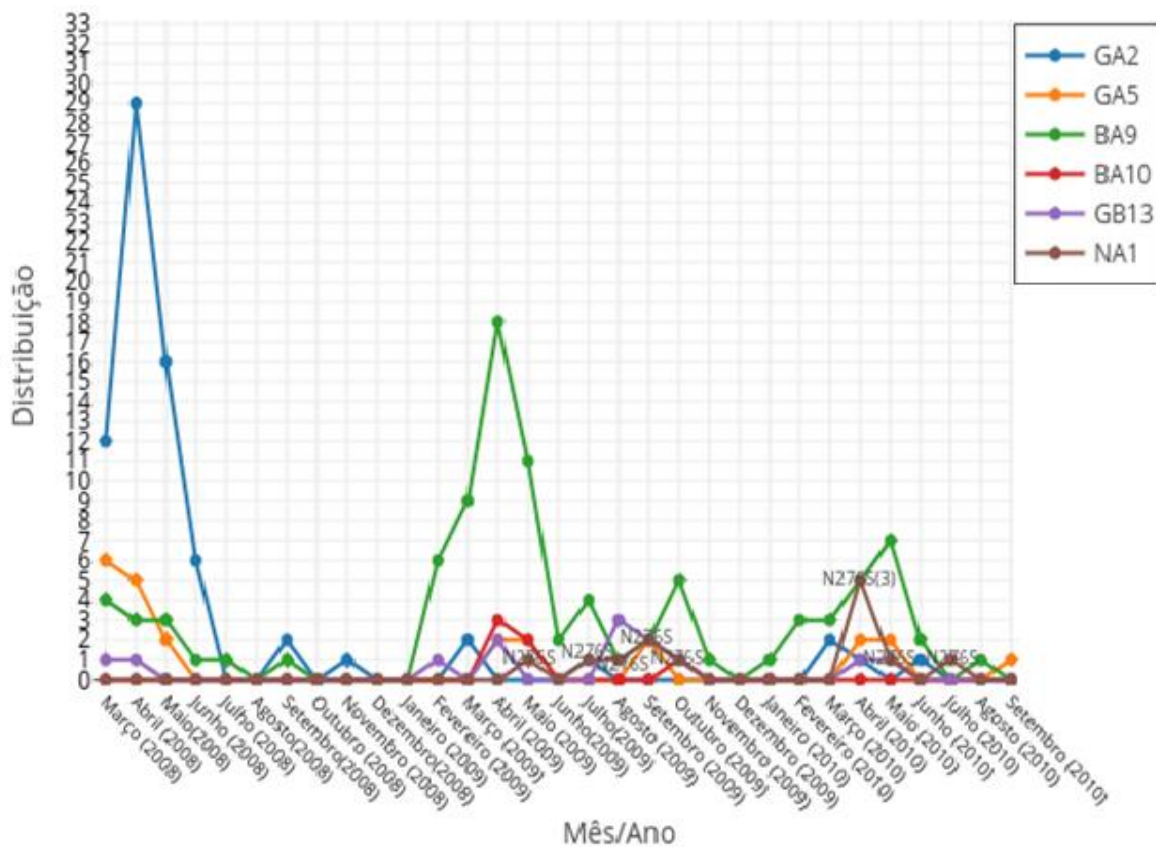


**Gráfico 3-** Genotipagem das seqüências deste trabalho. Antes e depois da redução da redundância. A= Genotipagem total da Santa casa com n° de 220; B= Genotipagem seqüências representativas parciais com n° de 127.



Fonte: O próprio autor, data

**Gráfico 4-** Distribuição dos genótipos e da mutação N276S ao longo do tempo nas 223 seqüências iniciais.



Fonte: O próprio autor, data

## 5.4 Variabilidade Molecular

### 5.4.1 Distância evolutiva e polimorfismos

Como o objetivo deste trabalho foi direcionado para a região de atuação do palvizumabe, as análises moleculares que não viabilizem um resultado comparativo e /ou local das sequências representativas parciais não foram realizados.

Analisar quão heterogêneo é um conjunto de dados é um fator crucial em qualquer análise evolutiva. Muitas vezes fatores observáveis não podem expor os dados á níveis tão minuciosos como por exemplo a distância entre dois conjuntos de dados, e quando estudamos vírus que tem características de flutuação sazonal, a diversidade de quaispécies por exemplo, pode influenciar incisivamente no surgimento de processos evolutivos, como mutações pontuais. No presente estudo podemos verificar a presença de dois subtipos (A e B) e dentro dos mesmos, 3 genótipos para cada subtipo GA2, GA5, NA1 para HRSVA e BA9, BA10 e GB13 para HRSVB. Esta análise foi realizada tanto nas sequências representativas parciais, como nas sequências representativas do sítio A.

Na tabela abaixo podemos verificar o grau de identidade entre as sequências do conjunto de dados.

**Tabela 3-** Média de identidade entre as sequências parciais representativas

Ano	Genótipo	Média Identidade nt (%)	Média Identidade aa (%)
<b>2008</b>	GA2 VS GA2	97.03	97.59
	GA2 VS GA5	95.41	98.29
	GA2 VS BA9	82.91	93.31
	GA2 VS GB13	82.95	93.39
	GA5 VS GA5	99.07	99.50
	GA5 VS BA9	84.34	94.42
	GA5 VS GB13	84.34	94.37
	BA9 VS BA9	99.51	99.36
	BA9 VS GB13	99.22	99.39
	GB13 VS GB13	98.77	99.26
<b>2009</b>	GA2 VS GA2	99.26	99.26
	GA2 VS GA5	91.51	94.00
	GA2 VS NA1	94.28	94.84
	GA2 VS BA9	78.70	88.22
	GA2 VS GB13	83.87	94.40
	GA5 VS GA5	89.02	88.77
	GA5 VS NA1	88.63	91.08
	GA5 VS BA9	75.63	83.83
	GA5 VS GB13	80.40	89.34
	NA1 VS NA1	90.97	91.28

	NA1 VS BA9	75.93	85.17
	NA1 VS GB13	80.79	91.01
	BA9 VS BA9	87.20	87.09
	BA9 VS GB13	92.73	92.86
	GB13 VS GB13	99.09	99.50
	BA10 VS BA10	80.95	80.94
	BA10 VS GA2	76.57	85.71
	BA10 VS GA5	73.56	81.34
	BA10 VS NA1	73.53	82.53
	BA10 VS BA9	84.96	85.04
	BA10 VS GB13	89.99	90.26
<b>2010</b>	GA2 VS GA2	94.93	95.65
	GA2 VS GA5	93.88	96.81
	GA2 VS NA1	95.48	96.16
	GA2 VS BA9	82.09	92.50
	GA5 VS GA5	98.84	98.92
	GA5 VS NA1	94.18	97.16
	GA5 VS BA9	83.84	93.60
	NA1 VS NA1	94.96*/90.35	95.15*/96.19
	NA1 VS BA9	82.43	92.92
	BA9 VS BA9	97.99	97.97

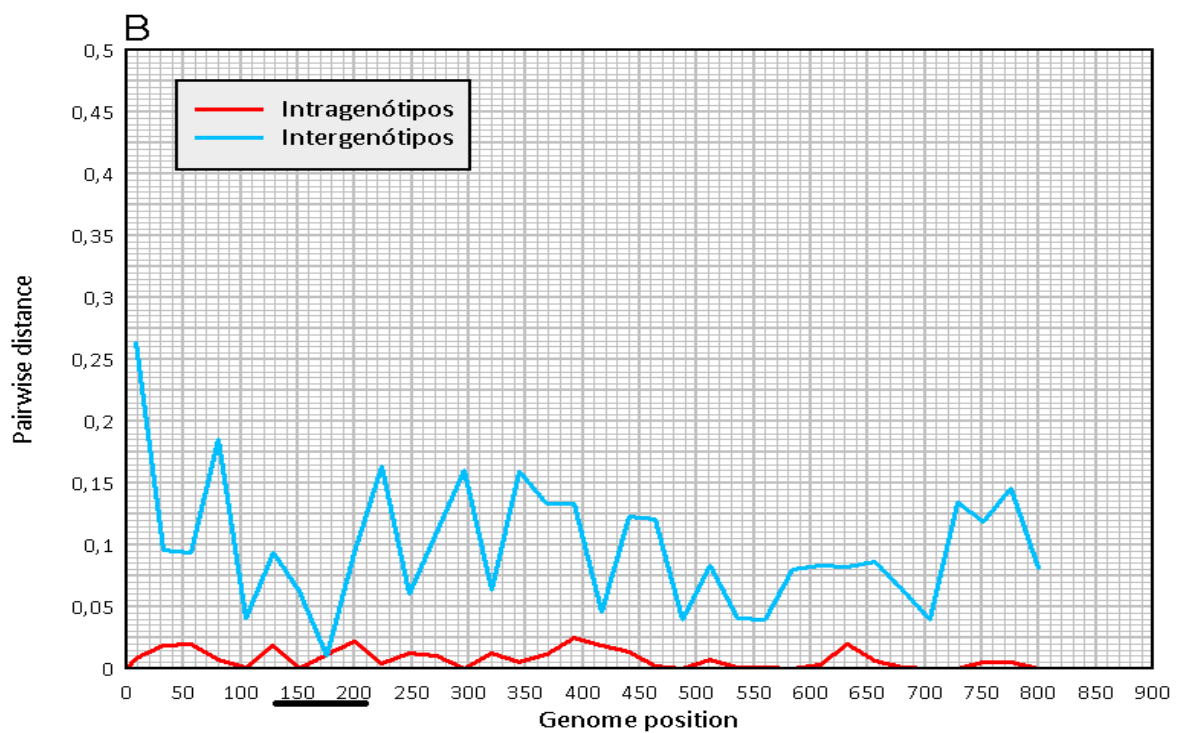
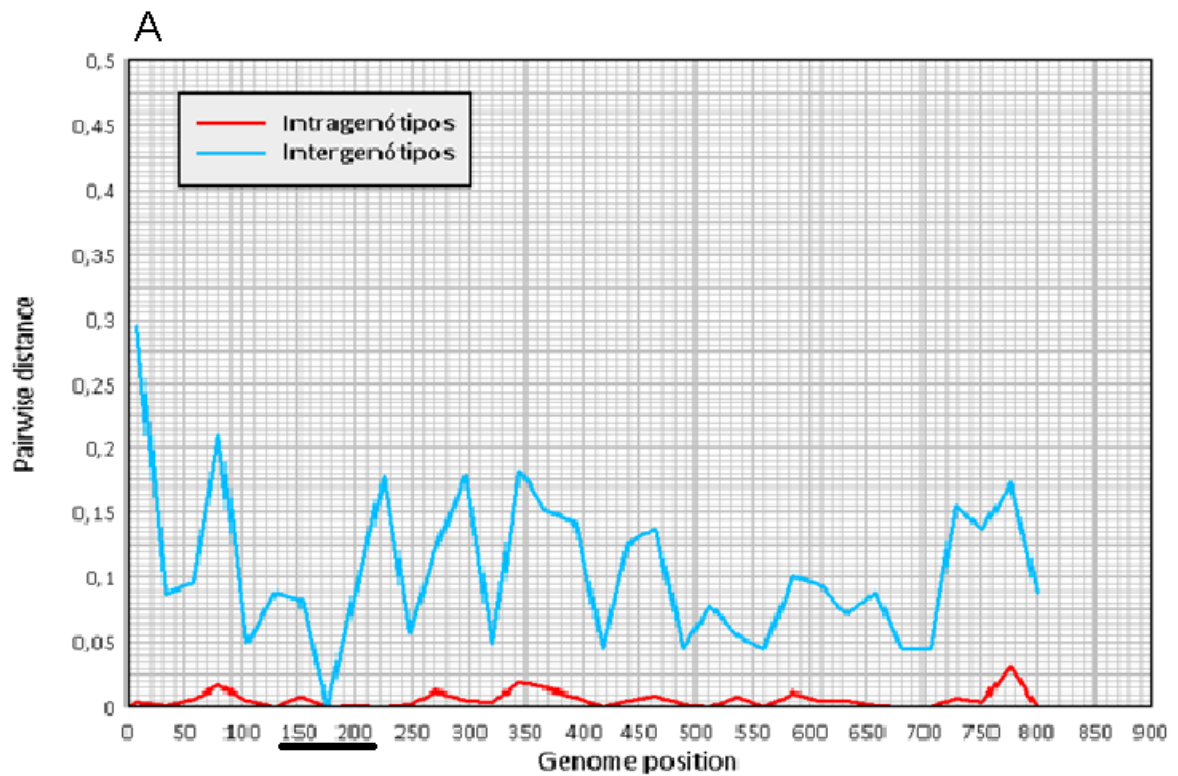
\*% identidade entre os mutantes.

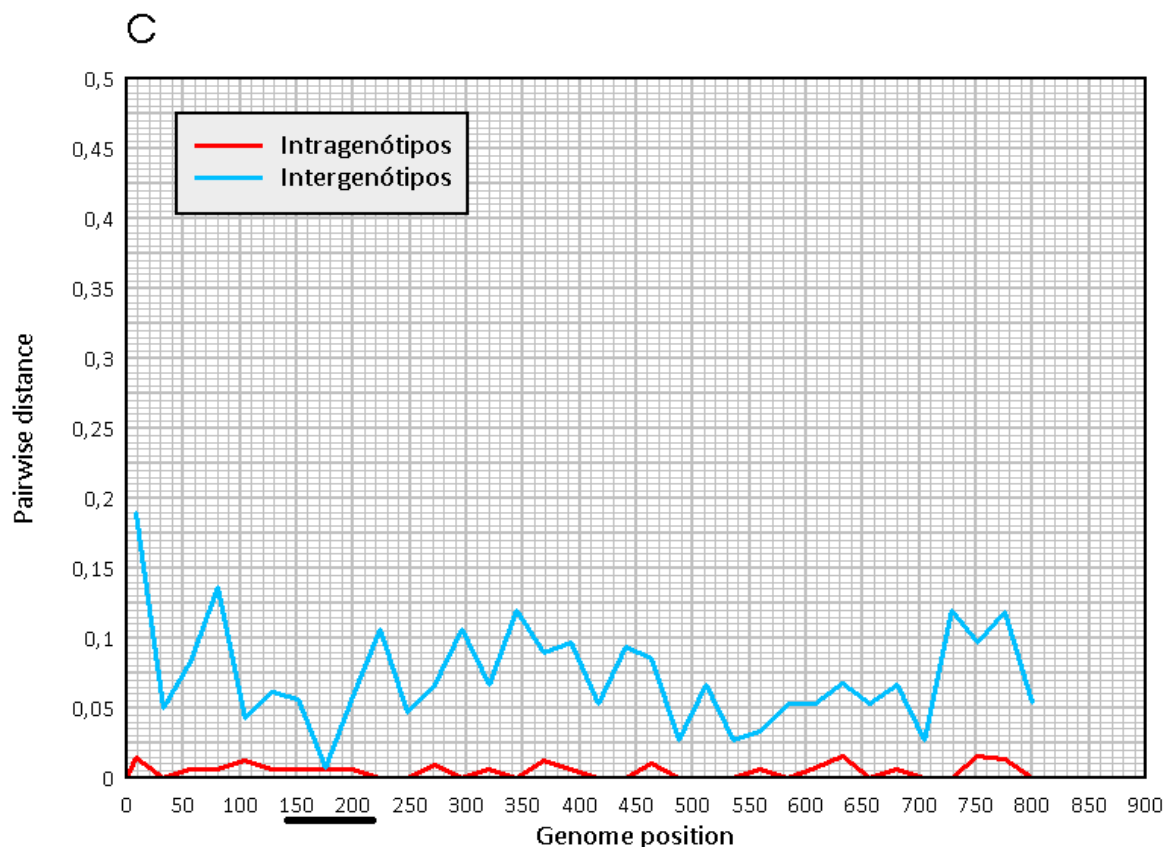
Fonte: O próprio autor, data

Dentro do Sítio A a média de identidade entre as sequências foi de 96% a nível nucleotídico e 100 % a nível de aminoácido, demonstrando o alto padrão de conservação na região de atuação do palivizumabe.

Utilizando a ferramenta de interface gráfica SSE, através do cálculo da distância-P foi possível representar graficamente a divergência intra e intergenótipos por ano das sequências da Santa Casa. Os gráficos 5 A, B e C nos mostram que a região do sítio A (marcado com uma linha escura) é justamente a região mais conservada nas sequências representativas parciais analisadas. A=2008; B=2009; C=2010

**Gráfico 5- A, B, C=** Distância nucleotídica aos pares, por local entre as sequências de 2008, 2009 e 2010 respectivamente. A linha escura abaixo indica a região do sítio A.





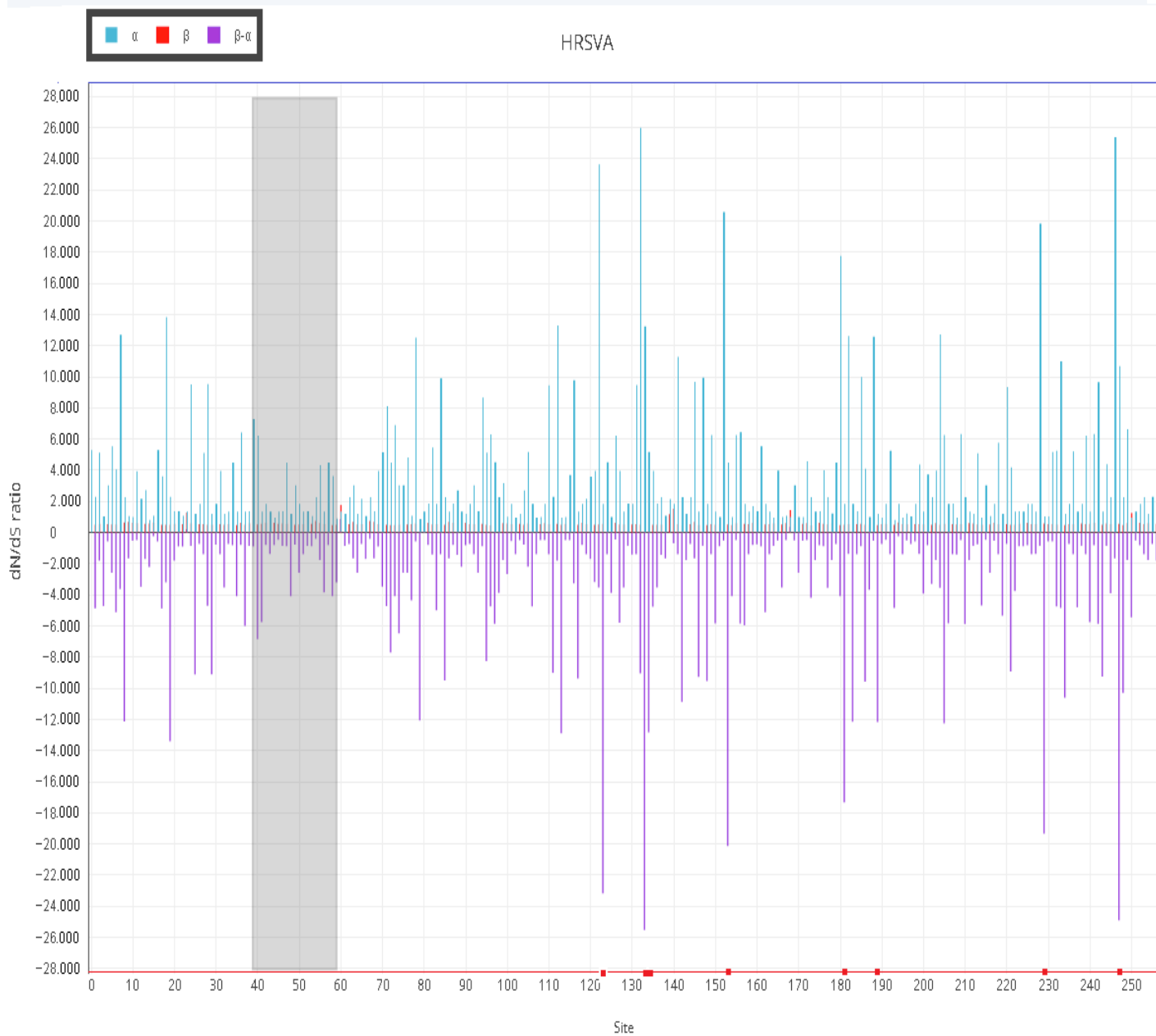
A análise de polimorfismos identificou 33 sítios polimórficos neutros e 3 sítios não neutros entre os dois subtipos. A região disponível das sequências não apresentou indels.

### 5.5 Análise de Pressão Seletiva

As predições de pressão seletiva realizadas nas sequências da Santa casa mostraram 8 sítios com possíveis eventos de seleção negativa/purificadora e 0 sítios com eventos de seleção positiva/diversificadora em HRSVA. Para HRSVB foram 11 sítios com possíveis eventos de seleção negativa/purificadora e 0 sítios com evento de seleção positiva/diversificadora. Os resultados podem ser representados graficamente abaixo. A análise não mostrou evento de seleção dentro da região de atuação do palvizumabe para os dois subtipos. A ferramenta FEL realiza a predição por ramos, por isto executa a inferência e fornece uma taxa para o conjunto de dados. A taxa  $dN/dS$  para o subtipo A foi de 0.0305 e para o subtipo B foi de 0.0558, ou seja, ambas as ferramentas predizeram eventos de pressão seletiva negativa nos dois subtipos.

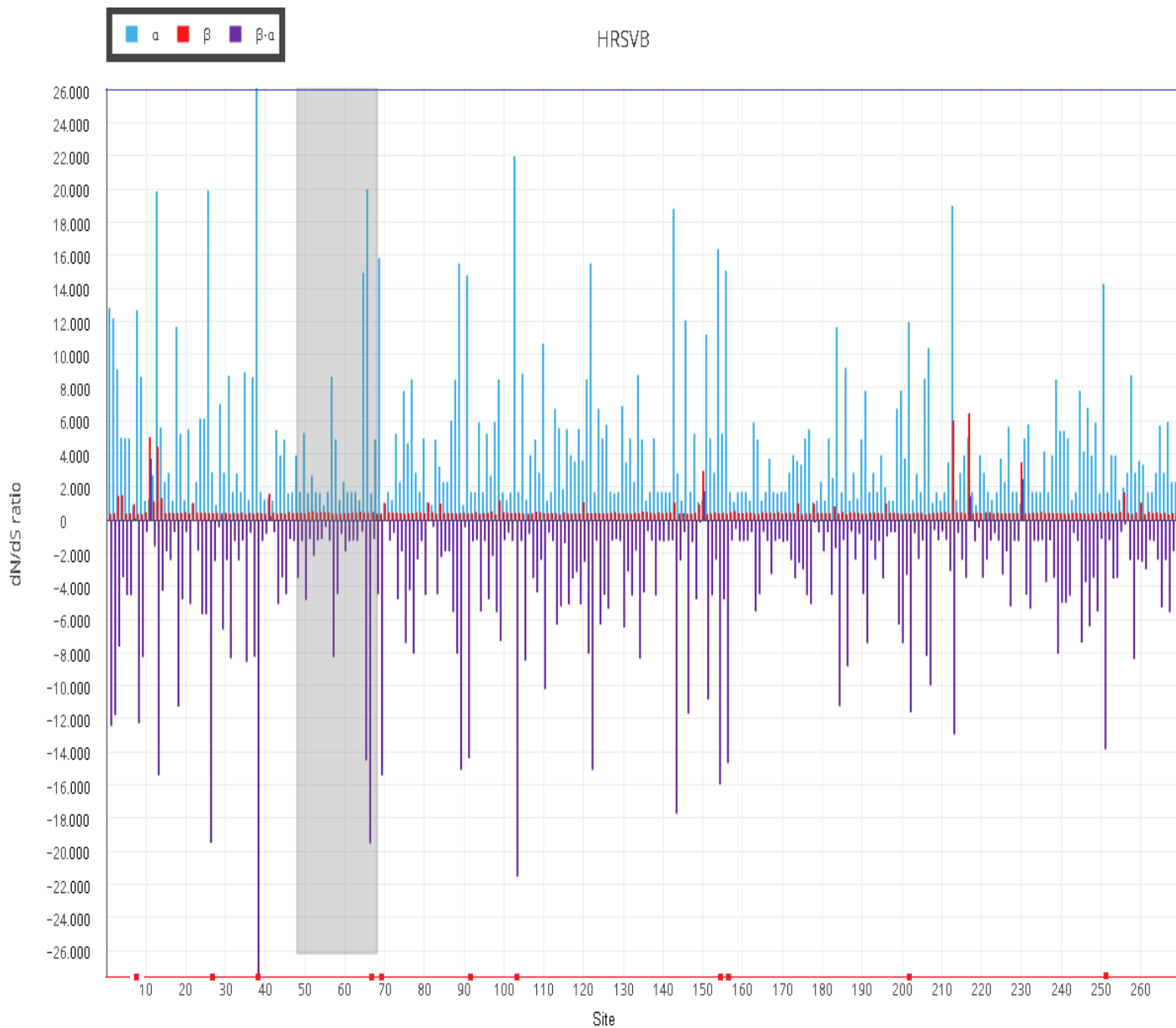


**Grafico 6-** Predição de pressão seletiva com FUBAR em HRSVA. Destacado com a barra cinza está o sitio A. Os pontos em vermelho indicam as regiões que foram preditas como estando sob seleção negative/purificadora.



Fonte: O próprio autor, data

**Grafico 7-** Predição de pressão seletiva com FUBAR em HRSVB. Destacado com a barra cinza está o sitio A. Os pontos em vermelho indicam as regiões que foram preditas como estando sob seleção negativa/purificadora.



Fonte: O próprio autor, data

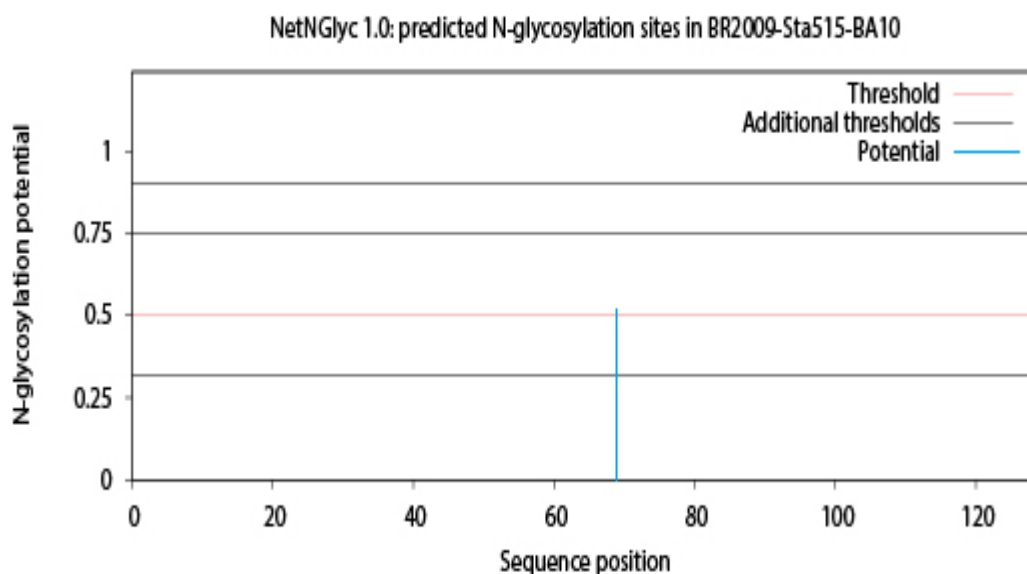
### 5.6 Predição de sítios N e O-Ligados

A predição de sítios de glicosilação foi realizada com as sequências representativas parciais através do servidor web Net-N-Glyc, que não identificou sítio de N-Glicosilação no subtipo A, e apenas 1 sítio com pontuação de 0,5213 na asparagina 285 da sequência BR2009\_Sta515\_BA10 do subtipo B como mostra o gráfico 8.

As mesmas sequências foram submetidas á análise no servidor Net-O-Glyc, que detectou a presença de possíveis sítios de O-glicosilação na Treonina (aa 244) e Serina (aa 248) apenas para o Subtipo A (75 sequências), com uma pontuação média de 0.51 para a primeira e 0.5 para a última. Os resultados da predição podem ser visualizados na tabela 4.

O programa em java modpred foi utilizado para verificar a confiabilidade da predição dos servidores web e retornou valores semelhantes aos mesmos.

**Grafico 8-** Predição de sitio de N-Glicosilação na sequência da Santa Casa.



**Tabela 4-** Predição de sítios de O-glicosilação para as 127 sequências de HRSV analisadas. As sequências de referência coletadas no banco de dados Refseq do NCBI para cada subtipo também foram utilizadas, porém nenhum sítio O-ligado foi predito.

ID Sequência	Posição (aa)	Pontuação	Posição (aa)	Pontuação
BR2008_STA09_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA101_GA2	244	0.516555	248	0.508188
BR2008_STA102_GA2	244	0.518672	248	0.5
BR2008_STA110_GA2	244	0.515964	248	0.5
BR2008_STA112_GA5	244	0.522013		
BR2008_STA117_GA2	244	0.515247		
BR2008_STA119_GA2	244	0.516155	248	0.51807
BR2008_STA122_GA2	244	0.521233	248	0.513947
BR2008_STA126_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA128_GA2	244	0.593191	248	0.528666
BR2008_STA139_GA5	244	0.527244	248	0.5
BR2008_STA144_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA146_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA149_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA155_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA176_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA178_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA18_GA2	244	0.524154	248	0.516783
BR2008_STA20_GA2	244	0.521233	248	0.513947
BR2008_STA21_GA5	244	0.522013		
BR2008_STA273_GA2	244	0.528254		
BR2008_STA28_GA5	244	0.522013		
BR2008_STA29_GA5	244	0.518672	248	0.5
BR2008_STA31_GA2	244	0.524154	248	0.516783
BR2008_STA34_GA2	244	0.518672	248	0.5
BR2008_STA353_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA39_GA5	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA40_GA5	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA41_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA42_GA2	244	0.581507	248	0.526967
BR2008_STA43_GA2	244	0.521233	248	0.513947
BR2008_STA46_GA5	244	0.512185		
BR2008_STA48_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA50_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA56_GA2	244	0.518672	248	0.5
BR2008_STA66_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA67_GA5	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA68_GA2	244	0.516155	248	0.51807
BR2008_STA69_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA70_GA2	244	0.518672	248	0.5
BR2008_STA79_GA2	244	0.515899	248	0.5

BR2008_STA80_GA2	244	0.518808	248	0.509921
BR2008_STA83_GA2	244	0.518672	248	0.5
BR2008_STA86_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA87_GA2	244	0.516155	248	0.51807
BR2008_STA89_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2008_STA91_GA2	244	0.514957	244	0.515899
BR2008_STA97_GA2	248	0.5		
BR2008_STA99_GA2	244	0.516155	248	0.51807
BR2009_STA444_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2009_STA457_GA2	244	0.515042	248	0.5
BR2009_STA460_GA5	244	0.51615	248	0.5
BR2009_STA500_NA1_MUT	244	0.519149	248	0.5
BR2009_STA528_GA5	244	0.518672	248	0.5
BR2009_STA561_GA2	244	0.52099	248	0.5
BR2009_STA600_NA1_MUT	244	0.519458	248	0.521886
BR2009_STA648_NA1_MUT	244	0.519149	248	0.5
BR2009_STA676_GA5	244	0.518672	248	0.5
BR2009_STA684_GA5	244	0.515899	248	0.5
BR2010_STA1006_GA5	244	0.516155	248	0.51807
BR2010_STA813_GA2	244	0.523788	248	0.5
BR2010_STA834_GA2	244	0.515899	248	0.5
BR2010_STA843_NA1_MUT	244	0.521352	248	0.5
BR2010_STA847_NA1	244	0.519149	248	0.5
BR2010_STA848_GA5	244	0.515899	248	0.5
BR2010_STA849_GA2	244	0.524123	248	0.510616
BR2010_STA852_GA5	244	0.515899	248	0.5
BR2010_STA854_NA1	244	0.528071	248	0.5
BR2010_STA860_NA1_MUT	244	0.519458	248	0.521886
BR2010_STA869_NA1_MUT	244	0.582388	248	0.528066
BR2010_STA877_NA1_MUT	244	0.519149	248	0.5
BR2010_STA907_GA5	244	0.516155	248	0.51807
BR2010_STA910_GA5	244	0.517587	248	0.5
BR2010_STA941_GA2	248	0.519544		
BR2010_STA955_NA1_MUT	244	0.515152	248	0.5

---

Fonte: O próprio autor, data



As predições para analisar os possíveis efeitos estruturais retornaram em sua maioria valores pouco consideráveis, com relação a mutações que resultariam em aumento da estabilidade proteica. Com relação a um possível aumento da estabilidade da proteína de fusão do HRSV do subtipo A, vale destacar a mutação S275L com um valor de  $\Delta\Delta G$  bastante considerável. Por outro lado, esta predição mostrou que as mutações dentro do sitio A podem ocasionar muitas reduções consideráveis na estabilidade proteica, como nas mutações I226M/V e K272T. Para a proteína de fusão do subtipo B, além da mutação S275L que ocasiona um aumento da estabilidade proteica, encontramos opostamente a isso a mutação L273F que reduz consideravelmente a estabilidade da mesma. As mutações na posição 276 não demonstraram influenciar estruturalmente a proteína F. Na figura 24 podemos visualizar o resultado da predição estrutural.

**Figura 24-** Predição de efeitos estruturais ocasionados pelas mutações já descritas dentro e nos aminoácidos vizinhos do Sitio A para HRSVA e HRSVB respectivamente. O valor do pseudo  $\Delta\Delta G$  é considerável se for  $>0.5$  para aumento na estabilidade ou  $<-0.5$  para redução na estabilidade.

Aminoácido	255										262					266					268					272					275					276																		
HR SVA	N	S	E	L	L	S	L	I	N	D	M	P	I	T	N	D	Q	K	K	L	M	S	N	N	N	D	Q	K	K	L	M	S	N	N	N	D	Q	K	K	L	M	S	N	N	N	D	Q	K	K	L	M	S	N	N
Mutação	S255N										N262H					I266M					N268I					K272G					S275L					N276Y																		
pseudo $\Delta\Delta G$	0.07										0.61					-1.08					0.98					-0.77					1.13					0.25																		
Saída	Increased stability										Increased stability					Reduced stability					Increased stability					Reduced stability					Increased stability					Increased stability																		
Mutação	S255G										N262D					I266V					K272N					S275Y					N276H																							
pseudo $\Delta\Delta G$	0.21										-0.65					-2.26					-0.52					0.34					0.61																							
Saída	Increased stability										Reduced stability					Reduced stability					Reduced stability					Increased stability					Increased stability																							
Mutação											N262S										K272M					S275F					N276S																							
pseudo $\Delta\Delta G$											-0.56										-0.05					0.19					-0.5																							
Saída											Reduced stability										Reduced stability					Increased stability					Reduced stability																							
Mutação																					K272T																																	
pseudo $\Delta\Delta G$																					-1.21																																	
Saída																					Reduced stability																																	
Mutação																					K272Q																																	
pseudo $\Delta\Delta G$																					0.64																																	
Saída																					Increased stability																																	
Mutação																					K272E																																	
pseudo $\Delta\Delta G$																					0.87																																	
Saída																					Increased stability																																	

Aminoácido	262										268					272					273					274					275					276																		
HR SVB	N	S	E	L	L	S	L	I	N	D	M	P	I	T	N	D	Q	K	K	L	M	S	S	N	N	D	Q	K	K	L	M	S	S	N	N	D	Q	K	K	L	M	S	S	N	N	D	Q	K	K	L	M	S	S	N
Mutação	N262I										N268D					K272E					L273F					M274V					S275L					S276N																		
pseudo $\Delta\Delta G$	-0.07										0.41					0.87					-1.14					-0.97					1.13					0.51																		
Saída	Reduced stability										Increased stability					Increased stability					Reduced stability					Reduced stability					Increased stability					Increased stability																		
Mutação	N262S																																																					
pseudo $\Delta\Delta G$	-0.56																																																					
Saída	Reduced stability																																																					

## 6. Discussão e Conclusão

A proteína de fusão é uma proteína de superfície do HRSV responsável pela fusão do envelope viral com a membrana hospedeira e a subsequente formação de sincícios. Esta proteína é glicosilada e é liberada na sua forma madura como um trímero metaestável chamada pré fusão, quando, ao entrar em contato com a célula alvo, a mesma sofre uma arojada alteração conformacional para a forma de pós-fusão menos estável.

A proteína F possui três domínios, o citoplasmático o transmembrana e o ectodomínio, tendo este último as regiões antigênicas de interesse. O ectodomínio possui diversos sítios antigênicos que estão presentes ou na forma de pré fusão desta proteína, ou na forma de pós fusão, bem como os sítios que estão presentes em ambas as formas como os sítios I, II e IV.

A região de interesse deste trabalho é conhecida como sitio A ou Sítio II, um local antigênico da proteína de fusão viral do HRSV, ao qual alguns anticorpos monoclonais humanizados (mABs) atuam, dentre eles o palivizumabe. Este sítio que compreende do aminoácido 262 ao 276 da proteína F, sendo sintetizada a partir do nucleotídeo 784 até o 825 (42 nucleotídeos/14 aminoácidos), é um local consideravelmente conservado dentre os isolados e como destacado por Crowe Jr em 1998 possui uma grande susceptibilidade á pressão seletiva induzida por anticorpos neutralizantes, principalmente entre os aminoácidos 266 e 276.

As análises realizadas nas sequências disponíveis da Santa Casa abrangeram uma porção de aproximadamente 15% da proteína de Fusão do HRSV, a qual incluiu o sítio de ligação ao anticorpo monoclonal palivizumabe que, de fato foi o local antigênico de interesse neste estudo.

O estudo de características evolutivas realizadas nesta porção são de extrema importância, haja visto que, atualmente não há vacina disponível para o HRSV e o monitoramento do surgimento de MARMs é essencial pois o único medicamento profilático aprovado contra a infecção pelo HRSV é o palivizumabe.

Uma coleta de sequências da proteína de fusão do HRSV no banco de dados do GenBank (1297 do subtipo A e 551 do subtipo B) permitiu uma análise comparativa, além da genotipagem e a correção do frame de leitura da porção disponível das sequências da Santa Casa que foram utilizadas neste estudo. Analisar a distribuição desta mutação neste banco de dados permitiu verificar a abrangência e distribuição



de caracteres evolutivos com ênfase nas mutações encontradas dentro do sítio de atuação do palivizumabe e que estivessem presentes também nas sequências da Santa Casa. O nível de conservação desta proteína foi semelhante em ambos os conjuntos de dados (Genbank e Santa Casa), sendo o nível de identidade superior a 90% entre os isolados, o que também pôde ser demonstrado através da exclusão da redundância que reduziu o conjunto de dados em 43% principalmente no genótipo BA9 do subtipo B e genótipo GA2 do subtipo A. O cálculo da distância entre as sequências dos dois subtipos demonstrou que, da porção disponível, o sítio de atuação do palivizumabe de fato foi a região mais conservada da proteína de F, o que indica que o palivizumabe ainda é um medicamento relativamente seguro para a utilização contra infecção pelo HRSV.

A característica de flutuação do HRSV esteve presente nas sequências da Santa Casa com os dois subtipos alternando entre os anos de 2008 e 2010.

Como demonstrado pela consulta realizada, a distribuição da mutação N276S (que esteve presente nas sequências da Santa Casa) é crescente no banco de dados do Genbank a partir de 2007 e fixou-se no subtipo A do HRSV. No conjunto de dados da Santa casa a mutação N276S esteve presente no genótipo NA1 de RSVA nos anos de 2009 e 2010, corroborando com os dados do NCBI.

Nos últimos anos a proteína de adesão de superfície (G) do HRSV tem sofrido modificações arrojadas em sua sequência, como por exemplo a introdução de duplicação dentro da região hipervariável 2 em ambos os subtipos. A proteína F é muito mais conservada a nível sequencial do que a proteína G, embora ambas estejam na superfície viral e contenham desta forma os epítomos de ligação á anticorpos neutralizantes. Estes fatores são cruciais para estabelecer a importância de uma análise de pressão seletiva que poderia estar presente nas sequências da Santa Casa, mesmo na ausência da imunoprofilaxia com o palivizumabe. Estas análises mostraram sítios preditos para a manutenção da sequência de nucleotídeos e consequentemente da sequência proteica da proteína F em ambos os subtipos. Também podemos verificar que esta manutenção está mais dispersa (estando inclusive em regiões próximas do sítio de atuação do palivizumabe), e em maior quantidade no subtipo B, o que pode explicar o fato de mutações dentro desta região, neste subtipo, serem tão raras e alto índice de identidade dentro do genótipo mais circulante (BA9).

Segundo Zimmer e Herrler, a proteína de fusão do HRSV possui 6 sítios de N-glicosilação característicos, estando presentes nos aminoácidos 27, 70, 116, 120, 126

e 500, concentrando-se em sua maioria dentro da porção F2 (186). Embora seja muitas vezes negligenciado em alguns trabalhos que tem como objetivo verificar a capacidade fusogênica e níveis de neutralização viral por mAbs, a variação nos locais de glicosilação influencia de forma bem clara estas características, como podemos verificar no trabalho de Zimmer e Herrler sobre a forma como os sítios de N-glicosilação afetam a atividade fusogênica da proteína de fusão do HRSV (186). Por isso avaliar possíveis variações nestes sítios é de grande importância. Além disso é importante salientar que o surgimento destas modificações pós traducionais podem implicar em alteração dos padrões imunológicos contra o patógeno, aumentando sua variação em determinada população.

Não há atualmente muitos trabalhos in vivo que enfatizem se as mutações que ocorrem dentro do sítio antigênico A ocasionam alguma modificação funcional (a nível de melhoramento ou pioramento proteico) ou estrutural na proteína de fusão viral, o que de fato poderia estar relacionado com o baixo índice de aptidão (fitness) dos mutantes de escape, como descrito na literatura (153,154,155). Mutações podem possuir caráter maléfico, benéfico ou neutro, e isto vai depender de diversos fatores, e podem trazer ao organismo outras diversas condições. Mutações dentro do sítio A já ocorrem, porém ela pode ser responsável pela diminuição da aptidão replicativa do vírus sincicial, mas isto ainda não está claro.

São necessários mais estudos in vivo com MARMs para analisar como suas proteínas estruturais reagem á estas mutações, funcionalmente e estruturalmente e assim poder compreender melhor o processo evolutivo.

A predição dos possíveis efeitos funcionais destas mutações no sitio A e aminoácidos vizinhos, mostrou que existem regiões na qual alterações de aminoácidos teriam efeito neutro, como nos sítios 254-256. Apresentando efeitos razoavelmente toleráveis podem-se destacar os sítios 259,267,270 e 275. Já entre os sítios no qual mutações teriam os maiores efeitos na função proteica pode-se destacar o sítio 263.

As predições para analisar os possíveis efeitos estruturais retornaram em sua maioria valores pouco consideráveis, com relação a mutações que resultariam em aumento da estabilidade proteica. Com relação a um possível aumento da estabilidade da proteína de fusão do RSV do subtipo A, vale destacar a mutação S275L com um valor de  $\Delta\Delta G$  bastante considerável. Por outro lado, esta predição mostrou que as

mutações dentro do sitio A podem ocasionar muitas reduções consideráveis na estabilidade proteica, como nas mutações I226M/V e K272T. Para a proteína de fusão do subtipo B, além da mutação S275L que ocasiona um aumento da estabilidade proteica, encontramos opostamente a isso a mutação L273F que 78 reduz consideravelmente a estabilidade da mesma. As mutações na posição 276 não demonstraram influenciar estruturalmente a proteína F.

No presente estudo podemos verificar pela primeira vez no Brasil a introdução da mutação N276S na população de HRSV do subtipo A nas amostras da Santa Casa de Misericórdia no ano de 2009 e sua manutenção no ano seguinte.

## 7. Referências Bibliográficas

1. MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Experimental Biology and Medicin*, Washington-DC, v. 92, n. 3, p. 544-549, jul. 1956.
2. CHANOCK, R.M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *Journal of Experimental Medicine*, Cincinnati, v. 104, n. 4, p.: 555–576, set. 1956.
3. CHANOCK, R; FINBERG, L. recovery from infants with respiratory illness of a virus re-lated to chimpanzee coryza agent (cca): epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *American Journal of Epidemiology*, v. 66, n. 3, p. 291–300, nov. 1957.
4. KILLIKELLY, A.M.; KANEKIYO, M; GRAHAM, B.S. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Scientific Reports*, Bethesda, v. 6, p. 34108, set. 2016.
5. GAROFALO, R. P. et al. Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  (Not T Helper Type 2 Cytokines) Is Associated with Severe Forms of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, n. 4, p. 393-399, nov. 2001.
6. TEBBEY, P.W.; HAGEN, M; HANCOCK, G.E. Atypical Pulmonary Eosinophilia Is Mediated by a Specific Amino Acid Sequence of the Attachment (G) Protein of Respiratory Syncytial Virus. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 10, p. 1967-1972, nov. 1998.
7. ANDERSON, L. J. et al. Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus Strains with Monoclonal Antibodies. *Journal of infectious diseases*, Chicago, v. 151, n. 4, p. 626-633, abr. 1985.
8. PERET, T. C. T. et al. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *Journal of General Virology*, Atlanta, v. 79, n. 9, p. 2221–2229, set. 1998.
9. SULLENDER, W.M. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clinical Microbiology Reviews* 13.1 (2000): 1–15. Print, v. 13, n. 1, p. 1-15, jan. 2000.

10. AFONSO, C. L. et al. Taxonomy of the order mononegavirales: update 2016. *Archives of virology*, v. 161, n. 8, p. 2351-2360, mai. 2004.
11. PERET, T. C. T. et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *The Journal of Infectious Diseases*, Atlanta, v. 181, n. 6, p. 1891–1896, jun. 2000.
12. VENTER, M. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 2117-2124, set. 2001.
13. SHOBUGAWA, Y. et al. Emerging Genotypes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A among Patients in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, Niigata, v. 47, n. 8, p. 2475-2482, ago. 2009.
14. ESHAGHI, A. et al. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS ONE*, Ontário, v. 7, n. 3, p. e32807, mar. 2012.
15. BAEK, Y. H. et al. Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. *Archives of Virology*, Cheongju, v. 157, n. 6, p. 1039–1050, jun. 2012.
16. CUI, G. et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e75020, dez. 2013.
17. REN, L. et al. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus subtype B: a novel genotype of subtype B circulating in China. *Journal of Medical Virology*, Chongqing, v. 87, n. 1, p. 1-9, jun. 2014.
18. ARNOTT, A. et al. A Study of the Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Cambodia Reveals the Existence of a New HRSV Group B Genotype. *Journal of Clinical Microbiology*, Phnom Penh, v. 49, n. 10, p. 3504–3513, out. 2011.
19. BLANC, A. et al. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Archives of Virology*, Montevideo, v. 150, n. 3, p. 603–609, mar. 2005.

20. TRENTO, A. et al. Natural History of Human Respiratory Syncytial Virus Inferred from Phylogenetic Analysis of the Attachment (G) Glycoprotein with a 60-Nucleotide Duplication. *Journal of Virology*, Madrid, v. 80, n. 2, p. 975-984, jul. 2006.
21. DAPAT, I. C. et al. New Genotypes within Respiratory Syncytial Virus Group B Genotype BA in Niigata, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3423-3427, set. 2010.
22. LILJEROOS, L. et al. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 27, p. 11133–11138, jul. 2013.
23. ROBERTS, S R; COMPANS, R W; WERTZ, G W. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, Birmingham, v. 69, n. 4, p. 2667-2673, abr. 1995.
24. GAROFALO, R.P.; KOLLI, D; CASOLA, A. Respiratory Syncytial Virus Infection: Mechanisms of Redox Control and Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, Galveston, v. 18, n. 2, p. 186–217, jan. 2013.
25. TENG, M.N.; COLLINS, P.L. Identification of the Respiratory Syncytial Virus Proteins Required for Formation and Passage of Helper-Dependent Infectious Particles. *Journal of Virology*, Bethesda, MD, v. 72, n. 7, p. 5707-5716, jul. 1998.
26. COLLINS, P. L. et al. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 15, p. 5134-5138, ago. 1987.
27. MINK, M.A; S, STEC, D.; L. COLLINS, P. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*, v. 185, n. 2, p. 615-624, dez. 1991.
28. KUO, L; FEARNES, R; COLLINS, P L. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *Journal of Virology*, v. 71, n. 7, p. 4944–4953, jul. 1997.
29. WU, W. et al. The Interactome of the Human Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Highlights Multiple Effects on Host Cell Biology. *Journal of Virology*, Leeds, v. 85, n. 15, p. 7777-7789, ago. 2012.

30. GOTOH, B. et al. Paramyxovirus Accessory Proteins as Interferon Antagonists. *Microbiology and Immunology*, v. 45, n. 12, p. 787-800, dez. 2001.
31. ATREYA, P.L.; PEEPLES, M.E.; COLLINS, P.L. The NS1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is a Potent Inhibitor of Minigenome Transcription and RNA Replication. *Journal of Virology*, USA, v. 72, n. 2, p. 1452-1461, fev. 1998.
32. TAWAR, R. G. et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science*, v. 326, n. 5957, p. 1279-1283, nov. 2009.
33. LING, Z; TRAN, K.C.; TENG, M.N. Human Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein NS2 Antagonizes the Activation of Beta Interferon Transcription by Interacting with RIG-I. *Journal of Virology*, v. 83, n. 8, p. 3734-3742, abr. 2009.
34. MUNIR, S. et al. Nonstructural Proteins 1 and 2 of Respiratory Syncytial Virus Suppress Maturation of Human Dendritic Cells. *Journal of Virology*, Bethesda, v. 82, n. 17, p. 8780–8796, set. 2008.
35. LIESMAN, R. M. et al. RSV-encoded NS2 promotes epithelial cell shedding and distal airway obstruction. *Journal of clinical investigation*, v. 124, n. 5, p: 2219-2233, abr. 2014.
36. GROSKREUTZ, D. J. et al. Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 31, p. 24023-24031, jul. 2010.
37. DUPUY, L. C. et al. Casein Kinase 2-Mediated Phosphorylation of Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein P Is Essential for the Transcription Elongation Activity of the Viral Polymerase; Phosphorylation by Casein Kinase 1 Occurs Mainly at Ser215 and Is without Effect. *Journal of Virology*, v. 73, n. 10, p. 8384-8392, out. 1999.
38. COLLINS, P L; CHANOCK, R.M.; R. MURPHY, B. *Fields virology: Respiratory syncytial virus*. 4 ed. Philadelphia: D.M. Knipe, P.M. Howley-Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1443-1485 p.

39. CASTAGNÉ, N. et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 1643-1653, jan. 2014.
40. CURRAN, J. et al. Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology*, v. 214, n. 1, p. 139-149, dez. 1995.
41. GROSFELD, H; HILL, M G; COLLINS, P L. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *Journal of Virology*, Bethesda, Maryland, v. 69, n. 9, p. 5677-5686. set. 1995.
42. LLORENTE, M. T. et al. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization. 01 January 2006, *Journal of General Virology*, v. 87, n. Pt 1, p. 159-169, jan. 2006.
43. GHILDYAL, R; HO, A; JANS, D.A. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 5, p. 692-705, jun. 2006.
44. KAPTUR, P E; RHODES, R B; LYLES, D S. Sequences of the vesicular stomatitis virus matrix protein involved in binding to nucleocapsids. *Journal of Virology*, Winston-Salem, v. 65, n. 3, p. 1057-1065, mar. 1991.
45. CORONEL, E. C. et al. Human Parainfluenza Virus Type 1 Matrix and Nucleoprotein Genes Transiently Expressed in Mammalian Cells Induce the Release of Virus-Like Particles Containing Nucleocapsid-Like Structures. *Journal of Virology*, Memphis, Tennessee, v. 73, n. 8, p. 7035-7038, ago. 1999.
46. GHILDYAL, R. et al. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 753-757, abr. 2002
47. BAJOREK, M. et al. The Thr205 Phosphorylation Site within Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Modulates M Oligomerization and Virus Production. *Journal of Virology*, v. 88, n. 11, p. 6380-6393, jun. 2014.



48. FÖRSTER, A. et al. Dimerization of Matrix Protein Is Required for Budding of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, v. 89, n. 8, p. 4624-4635, set. 2010.
49. COLLINS, P.L.; MOTTET, G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, Bethesda, v. 74, n. 1445-1450, jul. 1993.
50. GAN, S. et al. The Small Hydrophobic Protein of the Human Respiratory Syncytial Virus Forms Pentameric Ion Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, n. 29, p. 24671-24689, jul. 2012.
51. RIXON, H. W. M. et al. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *Journal of Virology* 1 May 2004, *Journal of General Virology* 85: 1153-1165, Glasgow, v. 85, n. Pt 5, p. 1153-1165, mai. 2004.
52. OLMSTED, R A; COLLINS, P L. The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *Journal of Virology*, Bethesda, v. 63, n. 5, p. 2019–2029, mai. 1989.
53. TRIANTAFILOU, K. et al. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax*, Cardiff, v. 68, n. 1, p. 66-75, jan. 2013.
54. FUENTES, S. et al. Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *Journal of Virology*. *Journal of Virology*, v. 81, n. 15, p. 8361-8366, ago. 2007.
55. YASUI, Y. et al. Cell fusion assay by expression of respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein to analyze the mutation of palivizumab-resistant strains. *Journal of Virological Methods*. Volume 231, 2016, Pages 48-55, v. 231, p. 48-55, mai. 2016.
56. COLLINS, P.L.; MOTTET, G. Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 849-863, abr. 1992.
57. MCLELLAN, J.S. et al. Structure and Function of RSV Surface Glycoproteins. *Current topics in microbiology and immunology*, Springer, Berlin, Heidelberg, v. 372, p. 83-104, set. 2013.

58. GORMAN, J. J. et al. Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Science: A Publication of the Protein Society, Parkville*, v. 6, n. 6, p. 1308–1315, jun. 1997.
59. TENG, M.N.; COLLINS, P.L. The Central Conserved Cystine Noose of the Attachment G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is Not Required for Efficient Viral Infection in Vitro or in Vivo. *Journal of Virology*, v. 76, n. 12, p. 6164-6171, jun. 2002.
60. HENDRICKS, D. A. et al. Appearance of a Soluble Form of the G Protein of Respiratory Syncytial Virus in Fluids of Infected Cells. *Journal of General Virology*, v. 68, p. 1705-1714, jun. 1987.
61. HENDRICKS, D A; MCINTOSH, K; PATTERSON, J L. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology, Framingham*, v. 62, n. 7, p. 2228–2233, jul. 1988.
62. ROBERTS, S. R. et al. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *Journal of Virology, Birmingham*, v. 68, n. 7, p. 4538–4546, jul. 1994.
63. BUKREYEV, A. et al. The Secreted Form of Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein Helps the Virus Evade Antibody-Mediated Restriction of Replication by Acting as an Antigen Decoy and through Effects on Fc Receptor-Bearing Leukocytes. *Journal of Virology*, v. 82, n. 24, p. 12191-12204, out. 2008.
64. BUKREYEV, A; YANG, L; COLLINS, P.L. The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement. *Journal of Virology*, v. 86, n. 19, p. 10880-10884, out. 2012.
65. CUI, G. et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e75020, dez. 2013.
66. TRENTO, A. et al. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *Journal of General Virology, Madrid*, v. 84, n. (Pt 11), p. 3115-3120, nov. 2003.

67. COMAS-GARCIA, A. et al. Respiratory Syncytial Virus-A ON1 Genotype Emergence in Central Mexico in 2009 and Evidence of Multiple Duplication Events. *The Journal of Infectious Diseases*, México, v. 217, n. 7, p. 1089–1098, mar. 2018.
68. TRIPP, R. A. et al. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nature Immunology* volume 2, pages 732–738 (2001), v. 2, p. 732–738, fev. 2001.
69. BAKRE, A. A. et al. The Central Conserved Region (CCR) of Respiratory Syncytial Virus (RSV) G Protein Modulates Host miRNA Expression and Alters the Cellular Response to Infection. *Vaccines, USA*, v. 5, n. 3, p. 16-16, set. 2017.
70. MALHOTRA, R. et al. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor (s) on epithelial cells. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 2, p. 123-133, fev. 2003.
71. ESCRIBANO-ROMERO, E. et al. The Soluble Form of Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Protein Differs from the Membrane-Bound Form in Its Oligomeric State but Is Still Capable of Binding to Cell Surface Proteoglycans. *Journal of Virology*, v. 78, n. 7, p. 3524-3532, abr. 2004.
72. MELERO, J A. Perspectives in medical virology: Molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus. 14 ed. Patricia Cane, 2006. 8 p.
73. GONZÁLEZ-REYES, L. et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 17, p. 9859-9864, ago. 2001.
74. ZHAO, X. et al. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 97, n. 26, p. 14172-7. dez. 2000.
75. COLLINS, P L; HUANG, Y T; WERTZ, G W. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, n. 24, p. 7683-7687, dez. 1984.

76. TAYYARI, F. et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, Vancouver, v. 17, n. 9, p. 1132-1135, ago. 2011.
77. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Approval package for synagis-palivizumab sponsor: medimmune, incorporated. Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/bla/2003/103770orig1s5033.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/bla/2003/103770orig1s5033.pdf)>. Acesso em: 13 fev. 2018.
78. AULABAUGH, A. et al. Inhibition of respiratory syncytial virus by a new class of chemotherapeutic agents. *Drugs of the future*, v. 25, n. 3, p. 287, dez. 2000.
79. LOW et al. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Nan-yang, v. 366, n. 2, p. 308-313, fev. 2008.
80. KARRON, R. A. et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 25, p. 13961–13966, dez. 1997.
81. SWANSON, K. A. et al. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *PNAS*, v. 103, n. 23, p. 9619-9624, jun. 2011.
82. WALSH, E; BRANDRISS, M.W; JACOB J.S. Purification and Characterization of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein. *Journal of general Virology*, New York, v. 66, p. 409-415, out. 1984.
83. WALSH, E. E. et al. Virus-Specific Antibody, Viral Load, and Disease Severity in Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 218, n. 2, p. 208–217, mar. 2018.
84. BEELER, J A; COELINGH, K.V.W. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *Journal of Virology*, Bethesda-USA, v. 63, n. 7, p. 2941-2950, jul. 1989.

85. ARBIZA, J. et al. Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2225-2234, set. 1992.
85. FLYNN, J. A. et al. Stability Characterization of a Vaccine Antigen Based on the Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein. *PLoS One*, v. 11, n. 10, p. e0164789, out. 2016.
86. HARDY, R. W et al. Diverse Gene Junctions of Respiratory Syncytial Virus Modulate the Efficiency of Transcription Termination and Respond Differently to M2-Mediated Antitermination. *Journal of virology*.v. 73, n. 1, p. 170-176, jan. 1999.
87. CARTEE, T.L.; WERTZ, G.W. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. *Journal of Virology*, v. 75, n. 24, p. 12188-97. fev. 2001.
88. ROUTLEDGE, E. G. et al. Expression of the Respiratory Syncytial Virus 22K Protein on the Surface of Infected HeLa Cells. 1987 Apr; 68 (Pt 4):1217-22. v. 68, n. 4, p. 1217-1722, abr. 1987.
89. TRAN, T. et al. The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. *Journal of Virology*, v. 83, n. 13, p. 6363–6374, jul. 2009.
90. FEARNES, R; COLLINS, P.L. Model for Polymerase Access to the Overlapped L Gene of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, Bethesda, Maryland, v. 73, n. 1, p. 388-397, jan. 1999.
91. FEARNES, R; COLLINS, P.L. Role of the M2-1 Transcription Antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sequential Transcription. *Journal of Virology*, v. 73, n. 7, p. 5852–5864, jul. 1999.
92. TANNER, S. J. et al. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 4, p. 1580-1585, jan. 2014.
93. COLLINS, P. L. et al. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 1, p. 81-85, jan. 1996.

94. STEC, DS; MG, Hill; PL, Collins. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology*, v. 183, n. 1, p. 273-287, jul. 1991.
95. COLLINS, P. L. et al. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 15, p. 5134-5138, ago. 1987.
96. FEARNES, R; COLLINS, P.L. Model for Polymerase Access to the Overlapped L Gene of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, Bethesda, Maryland, v. 73, n. 1, p. 388-397, jan. 1999.
97. LI, J; ZHANG, Y. Messenger rna cap methylation in vesicular stomatitis virus, a prototype of non-segmented negative-sense RNA virus. Anica Dricu ed.: Intech, 2012. 237-260 p.
98. POCH, O. et al. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1153-1162, mai. 1990.
99. OGINO, T; BANERJEE, A.K. Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Molecular Cell*, Cleveland, v. 25, n. 1, p. 85-97, jan. 2007.
100. DEVAL, J. et al. Molecular Basis for the Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase by 2'-Fluoro-4'-Chloromethyl-Cytidine Triphosphate. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 6, p. e1004995., jun. 2015.
101. LIANG, B. et al. Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy. *HHS Author Manuscripts-Cell*, Boston, v. 162, n. 2, p. 314-327, jul. 2015.
102. HANLEY, L. L. et al. Roles of the respiratory syncytial virus trailer region: Effects of mutations on genome production and stress granule formation. *Virology*, v. 406, n. 2, p. 241-252, out/nov. 2010.
103. WHELAN, S.P.J; WERTZ, G.W. The 5' Terminal Trailer Region of Vesicular Stomatitis Virus Contains a Position-Dependent cis-Acting Signal for Assembly of RNA

- into Infectious Particles. *Journal of Virology*, Birmingham, v. 73, n. 1, p. 307-315, jan. 1999.
104. ISENI, F. et al. Sendai virus trailer RNA binds TIAR, a cellular protein involved in virus-induced apoptosis. *The EMBO Journal*, v. 21, n. 19, p. 5141-5150, out. 2002.
105. ZHANG, L. et al. Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Airway Epithelial Cells Is Polarized, Specific to Ciliated Cells, and without Obvious Cytopathology. *Journal of Virology*, v. 76, n. 11, p. 5654–5666, jun. 2002.
106. COLLINS, P.L et al. Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 372, p. 3-38, mar. 2013.
107. GUTIÉRREZ-ORTEGA, A; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C; GÓMEZ-GARCÍA, B; Respiratory syncytial virus glycoproteins uptake occurs through clathrin-mediated endocytosis in a human epithelial cell line. *Virology Journal*. 2008; 5:127. v. 5, p. 127, out. 2008.
108. GARCÍA, J. et al. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology*, v. 195, n. 1, p. 243-247, jul. 1993.
109. BERMINGHAM, A; COLLINS, P.L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bethesda-USA, v. 96, n. 20, p. 11259-11264, set. 1999.
110. ASHRAFUZZAMAN, MD. et al (2017). *Ec. Microbiology Review Article Replication and Transcriptional Regulation Review of Respiratory Syncytial Virus (RSV)*. 7. 58-66.
111. COLLINS PL; CHANOCK RM; MURPHY BR; Respiratory syncytial virus. *Fields Virology* (Knipe DM & Howlet PM, eds). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1443–1485. 2001
112. TREMAGLIO, C. Z. et al. Respiratory syncytial virus polymerase can initiate transcription from position 3 of the leader promoter. *Journal of virology* vol. 87,6 (2013): 3196-207., Boston, v. 87, n. 6, p. 3196-3207, mar. 2013.

113. GOWER, T. L. et al. RhoA Signaling Is Required for Respiratory Syncytial Virus-Induced Syncytium Formation and Filamentous Virion Morphology. *Journal of virology*, Columbus, v. 79, n. 9, p. 5326-5336, mai. 2005.
114. SHAIKH, F. Y. et al. Respiratory Syncytial Virus Assembles into Structured Filamentous Virion Particles Independently of Host Cytoskeleton and Related Proteins. *PloS one*, Nashville, v. 7, n. 7, p. e40826, jul. 2012.
115. VANOVER, D. et al. RSV glycoprotein and genomic RNA dynamics reveal filament assembly prior to the plasma membrane. *Nature Communications*, v. 8, n. 667, set. 2017.
116. DUBOIS, J. et al. Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *Journal of General Virology*, v. 98, n. 6, p. 1174-1180, jun. 2017.
117. LI, M. et al. Respiratory Syncytial Virus Replication is promoted by autophagy-mediated inhibition of apoptosis. *Journal of virology*, Hebei, v. 92, n. 8, p. e02193-17, mar. 2018.
118. LANGLEY, J. et al. Economic evaluation of respiratory syncytial virus infection in Canadian children: a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *The Journal of Pediatrics*, Halifax, v. 131, n. 1, p. 113-117, jul. 1997.
119. SIMON, A. et al. Nosocomial infection: A risk factor for a complicated course in children with respiratory syncytial virus infection – Results from a prospective multi-center German surveillance study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Bonn, v. 211, n. 34, p. 241-250, jul. 2008
120. KRILOV, L.R. Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, New York, v. 9, n. 1, p. 27-32, jan. 2011.
121. PIEDIMONTE, G; PEREZ, M.K. Respiratory Syncytial Virus Infection and Bronchiolitis. *Pediatrics in review*, Cleveland, v. 35, n. 12, p. 519-530, dez. 2014.
122. FALSEY, A. R. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*, Rochester, v. 352, n. 17, p. 1749-1759, abr. 2005.



123. MEDSCAPE. Respiratory syncytial virus infection. Disponível em: <<https://emedicine.medscape.com/article/971488-overview>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

124. YOUTUBE. Khan academy medicine. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=9ezuhlsnuv0>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

125. WU, P; HARTE, T.V. Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma. Expert review of anti-infective therapy, Nashville, v. 9, n. 9, p. 731-745, set. 2011.

126. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de atenção à saúde. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0522\\_13\\_05\\_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0522_13_05_2013.html)>. Acesso em: 12 jul. 2018.

127. SCIENCEDAILY. How immunity to respiratory syncytial virus develops in childhood, deteriorates in adults. Disponível em: <<[www.sciencedaily.com releases="" 2016="" 04="" 160421145747.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2016/04/20160421145747.htm)>>. Acesso em: 21 abr. 2016.

128. FUENTES, S. et al. Antigenic Fingerprinting following Primary RSV Infection in Young Children Identifies Novel Antigenic Sites and Reveals Unlinked Evolution of Human Antibody Repertoires to Fusion and Attachment Glycoproteins. Plos Pathogens, v. 12, n. 4, p. e1005554., abr. 2016

129. SANICAS, M; SRICHAROENCHAI, S; PALLA, E. Seasonality of Respiratory Syncytial Virus - Lower Respiratory Tract Infection (RSV-LRTI) in Children in Developing Countries. Journal of Human Virology, Siena, v. 3, n. 1, fev/jan. 2016.

130. BAWAGE, S. S. et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. Advances in Virology, abr./jun. 2013.

131. POPOW-KRAUPP, T; ABERLE, J.H. Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection. The Open Microbiology Journal, v. 5, p. 128–134, abr./jun. 2011.

132. HEIKKINEN, T. et al. Nasal Swab versus Nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses. Journal of clinical microbiology, Turku, v. 40, n. 11, p. 4337-4339, ago/nov. 2002.

133. LANGEDIJK, J. P. et al. Structural Homology of the Central Conserved Region of the Attachment Protein G of Respiratory Syncytial Virus with the Fourth Subdomain of 55-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Virology*, Lelystad, v. 243, n. 2, p. 293-302, abr. 1998.
134. WELLIVER, R. C. et al. The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: kinetics of class-specific responses. *The Journal of Pediatrics*, v. 96, n. 5, p. 808–813, mai. 1980.
135. AMBROSE, C.S.; MCLAURIN, K.K. The Medicaid Cost of Palivizumab. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, Gaithersburg, v. 4, n. 1, p. 83-84, mar. 2015.
136. KIM, H. W. et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v. 89, n. 4, p. 422–434, ago. 1969.
137. KAPIKIAN, A. Z. et al. an epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (rs) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated rs virus vaccine. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v. 89, n. 4, p. 405-421, abr. 1969.
138. JORDAN, R. et al. Antiviral efficacy of an RSV fusion inhibitor in a bovine model of RSV infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, California, v. 59, n. 8, p. 4889-4900, ago. 2015.
139. WU, H. et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *Journal of Molecular Biology*, Gaithersburg, v. 368, n. 3, p. 652-665, mai. 2007.
140. CINGOZ, O. Motavizumab. *MAbs*, v. 1, n. 5, p. 439–442, set. 2009.
141. DRUGBANK. Palivizumab. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/db00110>>. Acesso em: 13 out. 2017.
142. MCLELLAN, J. S. et al. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. *Nature structural & molecular biology*, v. 17, n. 2, p. 248-250, jan/fev. 2010.
143. DOMACHOWSKE, J. B. et al. A Single Dose Monoclonal Antibody (mAb) Immunoprophylaxis Strategy to Prevent RSV Disease in All Infants: Results of the First

in Infant Study with MEDI8897. *Open Forum Infectious Diseases*, Gaithersburg, v. 4, n. 1, p. S37, fev/out. 2017.

144. DETALLE, L. et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 1, p. 6-13, jan. 2016.

145. GAILLARD, V. et al. A Short Double-Stapled Peptide Inhibits Respiratory Syncytial Virus Entry and Spreading. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 4, p. e02241-16, abr. 2017.

146. VILLAFANA, T. et al. Passive and active immunization against respiratory syncytial virus for the young and old. *Journal Expert Review of Vaccines*, Gaithersburg, v. 16, n. 7, p. 737-749, jul. 2017.

147. MCLELLAN, J. S. et al. Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *Science*, v. 342, n. 6158, p. 592-598, nov. 2013.

148. FEDECHKIN, S. O. et al. Structures of respiratory syncytial virus G antigen bound to broadly neutralizing antibodies. *Science Immunology*, Santa Cruz, v. 3, n. 21, p. eaar3534, jul. 2018.

149. CHALLA, S. et al. Mechanism of Action for Respiratory Syncytial Virus Inhibitor RSV604. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, Waltham, v. 59, n. 2, p. 1080-7, fev/jan. 2015.

150. GROUP RSV. The Impact-RSV Study. Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization from Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants. *Pediatrics*, v. 102, n. 3, set. 1998.

151. FEARNES, R; DEVAL, J. New antiviral approaches for respiratory syncytial virus and other mononegaviruses: Inhibiting the RNA polymerase. *Antiviral Research*, v. 134, p. 63-76, jul. 2016.

152. ADAMS, O. et al. Palivizumab Resistant Human Respiratory Syncytial Virus Infection in Infancy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 2, p. 185–188, mai. 2010.

153. ZHU, Q. et al. Analysis of Respiratory Syncytial Virus Preclinical and Clinical Variants Resistant to Neutralization by Monoclonal Antibodies Palivizumab and/or Motavizumab. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 5, p. 674-682., mar. 2011.

154. PAPPENBURG, J. et al. Molecular Evolution of Respiratory Syncytial Virus Fusion Gene, Canada, 2006–2010. *Emerging Infectious Disease*, Québec City, v. 18, n. 1, p. 120-124, jan. 2012.
155. ZHU, Q. et al. Natural Polymorphisms and Resistance-Associated Mutations in the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV): Effects on RSV Susceptibility to Palivizumab. *The Journal of Infectious Diseases*, Gaithersburg, v. 205, n. 4, p. 635-638, fev. 2012.
156. SWINDELL, S.R.; PLASTERER, T.N. Sequence data analysis guidebook: SEQMAN Contig Assemb. 70 ed. S R Swindell Humana Press Inc, 1997. 75-89 p.
157. LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, v. 30, n. 22, p. 3276-3278, nov. 2014.
158. EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, nov. 2013.
159. VILSKER, M. et al. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, v. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty695>, n. Bty695, ago. 2016.
160. GENOME DETECTIVE. Aga - advanced genome aligner. Disponível em: <<https://www.genomedetective.com/app/aga>>. Acesso em: 10 mai. 2018.
161. PETERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput Chem.* v. 25, n. 13, p. 1605-1612, jul. 2004.
162. REFSEQ. Ncbi reference sequence database. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>>. Acesso em: 06 nov. 2018.
163. MCLELLAN, J. S. et al. Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *Journal of Virology*, v. 85, n. 15, p. 7788-7796, ago. 2011.
164. PDB. Protein datbank. Disponível em: <<https://www.rcsb.org>>. Acesso em: 10 set. 2018.
165. CLEWLEY, J. P; ARNOLD, Cath. MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE. *Methods in Molecular Biology*, v. 70, p. 119-129, fev. 1997.

166. THOMPSON, J D; HIGGINS, D G; GIBSON, T J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, nov. 1994.
167. SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, jul. 1987.
168. KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016.
169. OKONECHNIKOV, K; GOLOSOVA, O; FURSOV, M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, Novosibirsk, v. 28, n. 8, p. 1166–1167, nov. 2013.
170. GENBANK. National center for biotechnology information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 07 ago. 2018.
171. SIMMONDS, P. SSE: A nucleotide and amino acid sequence analysis platform. *BMC Research Notes* 2012
172. LIBRADO, P; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, Barcelona, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, nov. 2013.
173. POND, S.L.et al. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, San Diego, v. 21, n. 5, p. 676–679, mar. 2005.
174. POND, L. K; FROST, S.D.W. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*, San Diego, v. 22, n. 5, p. 1208-1222, mai. 2005.
175. DATAMONKEY. Adaptive evolution server. Disponível em: <<https://www.data-monkey.org/>>. Acesso em: 08 out. 2018.
176. MURRELL, B. et al. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection *Molecular Biology and Evolution*. *Molecular Biology and Evolution*, Cape Town, South Africa, v. 30, n. 5, p. 1196-1205, jan. 2012.

177. STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 2013 May 15; Copenhagen, v. 32, n. 10, p. 1478–1488, mai. 2013.
178. NETOGLYC. Dtu bioinformatics departament of bio and health informatics. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc/>>. Acesso em: 10 jul. 2018.
179. GUPTA, R.; E. JUNG; BRUNAK. S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *ND*, v. 46, p. 203-206, jan. 2012.
180. NETNGLYC 1.0 SERVER. Dtu bioinformatics departament of bio and health informatics. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/netnglyc/>>. Acesso em: 20 jun. 2018.
181. PEJAVER, V. et al. The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Science*, v. 23, n. 8, p. 1077–1093, ago. 2014.
182. PANDURANGAN, A. P. et al. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. Web Server issue, p. W229–W235, nov. 2013.
183. SDM-SITE DIRECTED MUTATOR. University of Cambridge. Disponível em: <<http://marid.bioc.cam.ac.uk/sdm2/>>. Acesso em: 11 jun. 2018.
184. SNAP2. Rostlab. Disponível em: <[https://rostlab.org/owiki/index.php/snap2\\_web\\_server](https://rostlab.org/owiki/index.php/snap2_web_server)>. Acesso em: 13 jun. 2018.
185. WEBLOGO. Weblogo. Disponível em: <<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>>. Acesso em: 14 mai. 2018.
186. ZIMMER, G; TROTZ, I; HERRLER, G. N-Glycans of F Protein Differentially Affect Fusion Activity of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, Hannover, Germany, v. 75, n. 10, p. 4744-4751, mai. 2001.
187. JR., J. E. C. et al. Monoclonal Antibody-Resistant Mutants Selected with a Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Human Antibody Fab Fragment (Fab 19) Define a Unique Epitope on the Fusion (F) Glycoprotein. *Virology*, Bethesda, v. 252, n. 2, p. 373-375, dez. 2012.

APÊNDICE A

1	BR2008_ Sta09_GA2	BR2008- Sta103 BA9			
2	BR2008_ Sta101_GA2	BR2009_ Sta532(r)_ BA9	BR2008- Sta103_BA9	BR2008- Sta103_BA9	
3	BR2008_ Sta102_GA2	BR2009_ Sta532_BA9		BR2008_ Sta111_BA9	
4	BR2008_ Sta105_GA2	BR2010_ Sta837_BA9		BR2008_ Sta140_BA9	
5	BR2008_ Sta106_GA5	BR2008_ Sta09_GA2	BR2008_ Sta09_GA2	BR2008_ Sta14_GB13	
6	BR2008_ Sta109_GA2	BR2008_ Sta101_GA2	BR2008_ Sta101_GA2	BR2008_ Sta152_BA9	
7	BR2008_ Sta11_GA2	BR2008_ Sta102_GA2		BR2008_ Sta190_BA9	
8	BR2008_ Sta110_GA2	BR2008_ Sta138_GA2	BR2008_ Sta102_GA2	BR2008_ Sta267_BA9	
9	BR2008_ Sta111_BA9	BR2008_ Sta37_GA2		BR2008_ Sta39(r)_ BA9	
10	BR2008_ Sta112_GA5	BR2008_ Sta105_GA2		BR2008_ Sta92_GB13	
11	BR2008_ Sta117_GA2	BR2008_ Sta106_GA5		BR2009_ Sta430_BA9	
12	BR2008_ Sta119_GA2	BR2008_ Sta109_GA2		BR2009_ Sta562_BA9	
13	BR2008_ Sta122_GA2	BR2008_ Sta124_GA2		BR2009_ Sta407_BA9	
14	BR2008_ Sta124_GA2	BR2008_ Sta143_GA2		BR2009_ Sta405_BA9	
15	BR2008_ Sta125_BA9	BR2008_ Sta155_GA2		BR2009_ Sta406_BA9	
16	BR2008_ Sta126_GA2	BR2008_ Sta173(r)_ GA2	BR2008_ Sta155_GA2	BR2009_ Sta413_BA9	
17	BR2008_ Sta128_GA2	BR2008_ Sta182_GA2		BR2009_ Sta437_BA9	
18	BR2008_ Sta136_GA2	BR2008_ Sta64_GA2		BR2009_ Sta458_BA9	
19	BR2008_ Sta138_GA2	BR2008_ Sta77_GA2		BR2009_ Sta473_BA9	
20	BR2008_ Sta139_GA5	BR2008_ Sta90_GA2		BR2009_ Sta477_BA9	
21	BR2008_ Sta14_GB13	BR2008_ Sta110_GA2	BR2008_ Sta110_GA2	BR2009_ Sta482_BA9	BR2008_ Sta140_BA9
22	BR2008_ Sta140_BA9	BR2008_ Sta111_BA9		BR2009_ Sta488_BA10	
23	BR2008_ Sta143_GA2	BR2008_ Sta32_BA9		BR2009_ Sta495(r)_ BA9	
24	BR2008_ Sta144_GA2	BR2008_ Sta63_BA9		BR2009_ Sta495_BA9	
25	BR2008_ Sta146_GA2	BR2009_ Sta687_BA9		BR2009_ Sta501(r)_ BA9	
26	BR2008_ Sta148_GA2	BR2009_ Sta409_GB13		BR2009_ Sta501_BA9	
27	BR2008_ Sta149_GA2	BR2009_ Sta464_GB13		BR2009_ Sta544_BA9	
28	BR2008_ Sta15_GA2	BR2009_ Sta483_BA9		BR2009_ Sta566_BA9	
29	BR2008_ Sta152_BA9	BR2009_ Sta496_BA9	BR2008_ Sta111_BA9	BR2009_ Sta569_BA9	
30	BR2008_ Sta155_GA2	BR2009_ Sta530_BA9		BR2009_ Sta609_GB13	
31	BR2008_ Sta157_GA2	BR2009_ Sta673_GB13		BR2009_ Sta631_GB13	
32	BR2008_ Sta162_GA2	BR2009_ Sta681_BA9		BR2009_ Sta663_BA9	
33	BR2008_ Sta173(r)_ GA2	BR2009_ Sta682_GB13		BR2009_ Sta694_BA9	
34	BR2008_ Sta173_GA2	BR2009_ Sta690-GB13		BR2009_ Sta725_BA9	
35	BR2008_ Sta176_GA2	BR2009_ Sta697_BA9		BR2009_ Sta730_BA9	
36	BR2008_ Sta178_GA2	BR2009_ Sta713_BA9		BR2010_ Sta765_BA9	
37	BR2008_ Sta18_GA2	BR2008_ Sta112_GA5	BR2008_ Sta112_GA5	BR2010_ Sta775_BA9	
38	BR2008_ Sta182_GA2	BR2008_ Sta117_GA2	BR2008_ Sta117_GA2	BR2010_ Sta846_BA9	
39	BR2008_ Sta190_BA9	BR2008_ Sta119_GA2	BR2008_ Sta119_GA2	BR2010_ Sta928_BA9	
40	BR2008_ Sta20_GA2	BR2008_ Sta122_GA2	BR2008_ Sta122_GA2	BR2010_ Sta932_BA9	
41	BR2008_ Sta21_GA5	BR2008_ Sta125_BA9		BR2008_ Sta09_GA2	
42	BR2008_ Sta26_BA9	BR2008_ Sta26_BA9		BR2008_ Sta112_GA5	
43	BR2008_ Sta267_BA9	BR2008_ Sta27_BA9		BR2008_ Sta39_BA9	
44	BR2008_ Sta27_BA9	BR2008_ Sta39_BA9	BR2008_ Sta39_BA9	BR2008_ Sta34_GA2	
45	BR2008_ Sta273(r)_ GA2	BR2008_ Sta78_BA9		BR2008_ Sta139_GA5	
46	BR2008_ Sta273_GA2	BR2009_ Sta508_BA9		BR2008_ Sta149_GA2	
47	BR2008_ Sta28_GA5	BR2010_ Sta856_BA9	BR2008_ Sta126_GA2	BR2008_ Sta28_GA5	
48	BR2008_ Sta29_GA5	BR2008_ Sta126_GA2	BR2008_ Sta128_GA2	BR2008_ Sta29_GA5	
49	BR2008_ Sta31_GA2	BR2008_ Sta128_GA2		BR2008_ Sta40_GA5	
50	BR2008_ Sta32_BA9	BR2008_ Sta136_GA2		BR2008_ Sta41_GA2	
51	BR2008_ Sta34_GA2	BR2008_ Sta34_GA2	BR2008_ Sta34_GA2	BR2008_ Sta46_GA5	
52	BR2008_ Sta353_GA2	BR2008_ Sta139_GA5	BR2008_ Sta139_GA5	BR2008_ Sta52_GA5	
53	BR2008_ Sta37_GA2	BR2008_ Sta140_BA9	BR2008_ Sta140_BA9	BR2008_ Sta67_GA5	BR2008_ Sta112_GA5
54	BR2008_ Sta39(r)_ BA9	BR2008_ Sta144_GA2	BR2008_ Sta144_GA2	BR2008_ Sta86_GA2	
55	BR2008_ Sta39_BA9	BR2008_ Sta146_GA2	BR2008_ Sta146_GA2	BR2008_ Sta89_GA2	
56	BR2008_ Sta40_GA5	BR2008_ Sta148_GA2		BR2009_ Sta460_GA5	
57	BR2008_ Sta41_GA2	BR2008_ Sta149_GA2		BR2009_ Sta471_GA5	
58	BR2008_ Sta42_GA2	BR2008_ Sta15_GA2	BR2008_ Sta149_GA2	BR2009_ Sta528_GA5	
59	BR2008_ Sta43_GA2	BR2008_ Sta162_GA2		BR2009_ Sta676_GA5	
60	BR2008_ Sta46_GA5	BR2008_ Sta173_GA2		BR2009_ Sta684_GA5	
61	BR2008_ Sta47_GA5	BR2008_ Sta14_GB13	BR2008_ Sta14_GB13	BR2010_ Sta1006_GA5	
62	BR2008_ Sta48_GA2	BR2008_ Sta152_BA9	BR2008_ Sta152_BA9	BR2010_ Sta848_GA5	
63	BR2008_ Sta50_GA2	BR2008_ Sta157_GA2		BR2010_ Sta852_GA5	
64	BR2008_ Sta51_GA2	BR2008_ Sta66_GA2	BR2008_ Sta66_GA2	BR2010_ Sta907_GA5	
65	BR2008_ Sta52_GA5	BR2008_ Sta176_GA2	BR2008_ Sta176_GA2	BR2010_ Sta910_GA5	
66	BR2008_ Sta56_GA2	BR2008_ Sta178_GA2	BR2008_ Sta178_GA2	BR2008_ Sta101_GA2	
67	BR2008_ Sta63_BA9	BR2008_ Sta18_GA2	BR2008_ Sta18_GA2	BR2008_ Sta102_GA2	
68	BR2008_ Sta64_GA2	BR2008_ Sta190_BA9	BR2008_ Sta190_BA9	BR2008_ Sta155_GA2	
69	BR2008_ Sta66_GA2	BR2008_ Sta20_GA2	BR2008_ Sta20_GA2	BR2008_ Sta110_GA2	
70	BR2008_ Sta67_GA5	BR2008_ Sta21_GA5	BR2008_ Sta21_GA5	BR2008_ Sta117_GA2	
71	BR2008_ Sta68_GA2	BR2008_ Sta267_BA9	BR2008_ Sta267_BA9	BR2008_ Sta119_GA2	
72	BR2008_ Sta69_GA2	BR2008_ Sta273(r)_ GA2		BR2008_ Sta122_GA2	
73	BR2008_ Sta70_GA2	BR2008_ Sta273_GA2	BR2008_ Sta273_GA2	BR2008_ Sta126_GA2	
74	BR2008_ Sta73_GA2	BR2008_ Sta28_GA5	BR2008_ Sta28_GA5	BR2008_ Sta128_GA2	

75	BR2008_Sta76_GA5	BR2008_Sta29_GA5	BR2008_Sta29_GA5	BR2008_Sta144_GA2	
76	BR2008_Sta77_GA2	BR2008_Sta31_GA2	BR2008_Sta31_GA2	BR2008_Sta146_GA2	
77	BR2008_Sta78_BA9	BR2008_Sta353_GA2	BR2008_Sta353_GA2	BR2008_Sta66_GA2	
78	BR2008_Sta79_GA2	BR2008_Sta39(r)_BA9	BR2008_Sta39(r)_BA9	BR2008_Sta178_GA2	
79	BR2008_Sta80_GA2	BR2008_Sta40_GA5	BR2008_Sta40_GA5	BR2008_Sta18_GA2	
80	BR2008_Sta81_GA2	BR2008_Sta41_GA2	BR2008_Sta41_GA2	BR2008_Sta20_GA2	
81	BR2008_Sta82_GA2	BR2008_Sta42_GA2	BR2008_Sta42_GA2	BR2008_Sta273_GA2	
82	BR2008_Sta83_GA2	BR2008_Sta43_GA2	BR2008_Sta43_GA2	BR2008_Sta31_GA2	
83	BR2008_Sta84_GA2	BR2008_Sta46_GA5	BR2008_Sta46_GA5	BR2008_Sta353_GA2	
84	BR2008_Sta86_GA2	BR2008_Sta48_GA2	BR2008_Sta48_GA2	BR2008_Sta42_GA2	
85	BR2008_Sta87_GA2	BR2008_Sta50_GA2		BR2008_Sta43_GA2	BR2008_Sta155_GA2
86	BR2008_Sta89_GA2	BR2008_Sta51_GA2		BR2008_Sta48_GA2	
87	BR2008_Sta90_GA2	BR2008_Sta73_GA2	BR2008_Sta50_GA2	BR2008_Sta50_GA2	
88	BR2008_Sta91_GA2	BR2008_Sta81_GA2		BR2008_Sta56_GA2	
89	BR2008_Sta92_GB13	BR2008_Sta84_GA2		BR2008_Sta68_GA2	
90	BR2008_Sta93_GA2	BR2008_Sta98_GA2		BR2008_Sta69_GA2	
91	BR2008_Sta97_GA2	BR2008_Sta52_GA5	BR2008_Sta52_GA5	BR2008_Sta70_GA2	
92	BR2008_Sta98_GA2	BR2008_Sta76_GA5		BR2008_Sta79_GA2	
93	BR2008_Sta99_GA2	BR2008_Sta56_GA2	BR2008_Sta56_GA2	BR2008_Sta80_GA2	
94	BR2008-Sta103_BA9	BR2008_Sta67_GA5	BR2008_Sta67_GA5	BR2008_Sta83_GA2	
95	BR2009_BER120_BA9	BR2008_Sta68_GA2	BR2008_Sta68_GA2	BR2008_Sta87_GA2	
96	BR2009_Sta403_BA9	BR2008_Sta69_GA2	BR2008_Sta69_GA2	BR2008_Sta91_GA2	
97	BR2009_Sta405_BA9	BR2008_Sta70_GA2		BR2008_Sta93_GA2	
98	BR2009_Sta406_BA9	BR2008_Sta82_GA2	BR2008_Sta70_GA2	BR2008_Sta97_GA2	
99	BR2009_Sta407_BA9	BR2008_Sta79_GA2	BR2008_Sta79_GA2	BR2008_Sta99_GA2	
100	BR2009_Sta409_GB13	BR2008_Sta80_GA2	BR2008_Sta80_GA2	BR2009_Sta444_GA2	
101	BR2009_Sta413_BA9	BR2008_Sta83_GA2	BR2008_Sta83_GA2	BR2009_Sta457_GA2	
102	BR2009_Sta420_BA9	BR2008_Sta86_GA2	BR2008_Sta86_GA2	BR2009_Sta561_GA2	
103	BR2009_Sta422_BA9	BR2008_Sta87_GA2	BR2008_Sta87_GA2	BR2010_Sta834_GA2	
104	BR2009_Sta426_BA9	BR2008_Sta89_GA2	BR2008_Sta89_GA2	BR2010_Sta941_GA2	
105	BR2009_Sta431_BA9	BR2008_Sta91_GA2	BR2008_Sta91_GA2	BR2008_Sta176_GA2	BR2008_Sta176_GA2
106	BR2009_Sta437_BA9	BR2008_Sta92_GB13	BR2008_Sta92_GB13	BR2008_Sta21_GA5	BR2008_Sta21_GA5
107	BR2009_Sta444_GA2	BR2008_Sta93_GA2	BR2008_Sta93_GA2	BR2009_Sta453_BA9	
108	BR2009_Sta447_BA9	BR2008_Sta97_GA2	BR2008_Sta97_GA2	BR2009_Sta542_BA9	BR2009_Sta453_BA9
109	BR2009_Sta453_BA9	BR2008_Sta99_GA2	BR2008_Sta99_GA2	BR2010_Sta784_BA9	
110	BR2009_Sta454_BA9	BR2009-Sta430_BA9		BR2010_Sta973_BA9	
111	BR2009_Sta456_GB13	BR2009_Sta420_BA9		BR2009_Sta456_GB13	BR2009_Sta456_GB13
112	BR2009_Sta457_GA2	BR2009_Sta426_BA9		BR2009_Sta685_BA10	
113	BR2009_Sta458_BA9	BR2009_Sta431_BA9		BR2009_Sta465_BA10	
114	BR2009_Sta460_GA5	BR2009_Sta454_BA9		BR2009_Sta478_BA10	BR2009_Sta465_BA10
115	BR2009_Sta463_BA9	BR2009_Sta463_BA9	BR2009-Sta430_BA9	BR2009_Sta510_BA10	
116	BR2009_Sta464_GB13	BR2009_Sta480_BA9		BR2009_Sta500_NA1	
117	BR2009_Sta465_BA10	BR2009_Sta489_BA9		BR2009_Sta600_NA1	
118	BR2009_Sta470_BA9	BR2009_Sta491_BA9		BR2010_Sta849_GA2	
119	BR2009_Sta471_GA5	BR2009_Sta494_BA9		BR2009_Sta648_NA1	
120	BR2009_Sta473_BA9	BR2009_Sta525_BA9		BR2009_Sta712_NA1	
121	BR2009_Sta475_BA9	BR2009_Sta580_BA9		BR2010_Sta843_NA1	BR2009_Sta500_NA1
122	BR2009_Sta476_BA9	BR2009_BER120_BA9	BR2009_Sta562_BA9	BR2010_Sta847_NA1	
123	BR2009_Sta477_BA9	BR2009_Sta562_BA9		BR2010_Sta854_NA1	
124	BR2009_Sta478_BA10	BR2009_Sta403_BA9		BR2010_Sta860_NA1	
125	BR2009_Sta480_BA9	BR2009_Sta407_BA9		BR2010_Sta869_NA1	
126	BR2009_Sta482_BA9	BR2009_Sta422_BA9		BR2010_Sta877_NA1	
127	BR2009_Sta483_BA9	BR2009_Sta475_BA9		BR2010_Sta955_NA1	
128	BR2009_Sta487_BA9	BR2009_Sta476_BA9	BR2009_Sta407_BA9	BR2009_Sta515_BA10	BR2009_Sta515_BA10
129	BR2009_Sta488_BA10	BR2009_Sta505_BA9		BR2009_Sta628_GB13	BR2009_Sta628_GB13
130	BR2009_Sta489_BA9	BR2009_Sta524_BA9		BR2010_Sta813_GA2	BR2010_Sta813_GA2
131	BR2009_Sta491_BA9	BR2009_Sta527_BA9			
132	BR2009_Sta494_BA9	BR2010_Sta886_BA9			
133	BR2009_Sta495(r)_BA9	BR2009_Sta405_BA9	BR2009_Sta405_BA9		
134	BR2009_Sta495_BA9	BR2009_Sta406_BA9	BR2009_Sta406_BA9		
135	BR2009_Sta496_BA9	BR2009_Sta413_BA9	BR2009_Sta413_BA9		
136	BR2009_Sta497_BA9	BR2009_Sta437_BA9	BR2009_Sta437_BA9		
137	BR2009_Sta500_NA1	BR2009_Sta444_GA2	BR2009_Sta444_GA2		
138	BR2009_Sta501(r)_BA9	BR2009_Sta447_BA9			
139	BR2009_Sta501_BA9	BR2009_Sta453_BA9			
140	BR2009_Sta505_BA9	BR2009_Sta470_BA9			
141	BR2009_Sta508_BA9	BR2009_Sta497_BA9			
142	BR2009_Sta510_BA10	BR2009_Sta511(r)_BA9			
143	BR2009_Sta511(r)_BA9	BR2009_Sta511_BA9			
144	BR2009_Sta511_BA9	BR2009_Sta630_BA9			
145	BR2009_Sta515_BA10	BR2010_Sta791_BA9	BR2009_Sta453_BA9		
146	BR2009_Sta524_BA9	BR2010_Sta824_BA9			
147	BR2009_Sta525_BA9	BR2010_Sta850_BA9			
148	BR2009_Sta527_BA9	BR2010_Sta866_BA9			
149	BR2009_Sta528_GA5	BR2010_Sta883_BA9			
150	BR2009_Sta530_BA9	BR2010_Sta884_BA9			



151	BR2009_Sta532(r)_BA9	BR2010_Sta894_BA9			
152	BR2009_Sta532_BA9	BR2010_Sta906_BA9			
153	BR2009_Sta542_BA9	BR2009_Sta456_GB13		BR2009_Sta456_GB13	
154	BR2009_Sta544_BA9	BR2010_Sta882_GB13			
155	BR2009_Sta561_GA2	BR2009_Sta457_GA2		BR2009_Sta457_GA2	
156	BR2009_Sta562_BA9	BR2009_Sta458_BA9		BR2009_Sta458_BA9	
157	BR2009_Sta566_BA9	BR2009_Sta487_BA9			
158	BR2009_Sta569_BA9	BR2009_Sta460_GA5		BR2009_Sta460_GA5	
159	BR2009_Sta580_BA9	BR2009_Sta465_BA10		BR2009_Sta465_BA10	
160	BR2009_Sta600_NA1	BR2009_Sta471_GA5		BR2009_Sta471_GA5	
161	BR2009_Sta609_GB13	BR2009_Sta473_BA9		BR2009_Sta473_BA9	
162	BR2009_Sta628_GB13	BR2009_Sta477_BA9		BR2009_Sta477_BA9	
163	BR2009_Sta630_BA9	BR2009_Sta478_BA10		BR2009_Sta478_BA10	
164	BR2009_Sta631_GB13	BR2009_Sta482_BA9		BR2009_Sta482_BA9	
165	BR2009_Sta632_GA2	BR2009_Sta488_BA10		BR2009_Sta488_BA10	
166	BR2009_Sta648_NA1	BR2009_Sta495(r)_BA9		BR2009_Sta495(r)_BA9	
167	BR2009_Sta658_NA1	BR2009_Sta495_BA9		BR2009_Sta495_BA9	
168	BR2009_Sta663_BA9	BR2009_Sta500_NA1		BR2009_Sta500_NA1	
169	BR2009_Sta673_GB13	BR2009_Sta501(r)_BA9		BR2009_Sta501(r)_BA9	
170	BR2009_Sta676_GA5	BR2009_Sta501_BA9		BR2009_Sta501_BA9	
171	BR2009_Sta681_BA9	BR2009_Sta510_BA10		BR2009_Sta510_BA10	
172	BR2009_Sta682_GB13	BR2009_Sta515_BA10		BR2009_Sta515_BA10	
173	BR2009_Sta684_GA5	BR2009_Sta528_GA5		BR2009_Sta528_GA5	
174	BR2009_Sta685_BA10	BR2009_Sta542_BA9		BR2009_Sta542_BA9	
175	BR2009_Sta690_GB13	BR2009_Sta544_BA9		BR2009_Sta544_BA9	
176	BR2009_Sta694_BA9	BR2009_Sta561_GA2		BR2009_Sta561_GA2	
177	BR2009_Sta697_BA9	BR2009_Sta566_BA9		BR2009_Sta566_BA9	
178	BR2009_Sta712_NA1	BR2010_Sta909_BA9			
179	BR2009_Sta713_BA9	BR2009_Sta569_BA9		BR2009_Sta569_BA9	
180	BR2009_Sta725_BA9	BR2009_Sta600_NA1		BR2009_Sta600_NA1	
181	BR2009_Sta730_BA9	BR2009_Sta609_GB13		BR2009_Sta609_GB13	
182	BR2009-Sta430_BA9	BR2010_Sta862_GB13			
183	BR2009-Sta687_BA9	BR2009_Sta628_GB13		BR2009_Sta628_GB13	
184	BR2010_Sta1006_GA5	BR2009_Sta631_GB13		BR2009_Sta631_GB13	
185	BR2010_Sta765_BA9	BR2009_Sta632_GA2			
186	BR2010_Sta775_BA9	BR2010_Sta849_GA2		BR2010_Sta849_GA2	
187	BR2010_Sta784_BA9	BR2009_Sta648_NA1		BR2009_Sta648_NA1	
188	BR2010_Sta791_BA9	BR2009_Sta658_NA1			
189	BR2010_Sta803_BA9	BR2009_Sta663_BA9		BR2009_Sta663_BA9	
190	BR2010_Sta813_GA2	BR2009_Sta676_GA5		BR2009_Sta676_GA5	
191	BR2010_Sta824_BA9	BR2009_Sta684_GA5		BR2009_Sta684_GA5	
192	BR2010_Sta834_GA2	BR2009_Sta685_BA10		BR2009_Sta685_BA10	
193	BR2010_Sta837_BA9	BR2009_Sta694_BA9		BR2009_Sta694_BA9	
194	BR2010_Sta843_NA1	BR2009_Sta712_NA1		BR2009_Sta712_NA1	
195	BR2010_Sta844_BA9	BR2009_Sta725_BA9		BR2009_Sta725_BA9	
196	BR2010_Sta846_BA9	BR2009_Sta730_BA9		BR2009_Sta730_BA9	
197	BR2010_Sta847_NA1	BR2010_Sta1006_GA5		BR2010_Sta1006_GA5	
198	BR2010_Sta848_GA5	BR2010_Sta765_BA9		BR2010_Sta765_BA9	
199	BR2010_Sta849_GA2	BR2010_Sta775_BA9			
200	BR2010_Sta850_BA9	BR2010_Sta803_BA9		BR2010_Sta775_BA9	
201	BR2010_Sta852_GA5	BR2010_Sta844_BA9			
202	BR2010_Sta854_NA1	BR2010_Sta784_BA9		BR2010_Sta784_BA9	
203	BR2010_Sta856_BA9	BR2010_Sta813_GA2		BR2010_Sta813_GA2	
204	BR2010_Sta860_NA1	BR2010_Sta834_GA2		BR2010_Sta834_GA2	
205	BR2010_Sta862_GB13	BR2010_Sta843_NA1		BR2010_Sta843_NA1	
206	BR2010_Sta866_BA9	BR2010_Sta846_BA9		BR2010_Sta846_BA9	
207	BR2010_Sta869_NA1	BR2010_Sta847_NA1		BR2010_Sta847_NA1	
208	BR2010_Sta877_NA1	BR2010_Sta848_GA5		BR2010_Sta848_GA5	
209	BR2010_Sta882_GB13	BR2010_Sta852_GA5		BR2010_Sta852_GA5	
210	BR2010_Sta883_BA9	BR2010_Sta854_NA1		BR2010_Sta854_NA1	
211	BR2010_Sta884_BA9	BR2010_Sta860_NA1		BR2010_Sta860_NA1	
212	BR2010_Sta886_BA9	BR2010_Sta869_NA1		BR2010_Sta869_NA1	
213	BR2010_Sta894_BA9	BR2010_Sta877_NA1		BR2010_Sta877_NA1	
214	BR2010_Sta904_BA9	BR2010_Sta907_GA5		BR2010_Sta907_GA5	
215	BR2010_Sta906_BA9	BR2010_Sta910_GA5		BR2010_Sta910_GA5	
216	BR2010_Sta907_GA5	BR2010_Sta928_BA9		BR2010_Sta928_BA9	
217	BR2010_Sta909_BA9	BR2010_Sta932_BA9		BR2010_Sta932_BA9	
218	BR2010_Sta910_GA5	BR2010_Sta941_GA2		BR2010_Sta941_GA2	
219	BR2010_Sta928_BA9	BR2010_Sta955_NA1		BR2010_Sta955_NA1	
220	BR2010_Sta932_BA9	BR2010_Sta973_BA9		BR2010_Sta973_BA9	
221	BR2010_Sta941_GA2				
222	BR2010_Sta955_NA1				
223	BR2010_Sta973_BA9				
	ETAPA-1	ETAPA-2	ETAPA-3	ETAPA-4	RESULTADO FINAL

## ETAPA

- 1 Seleção das seqüências apropriadas para a análise, após montagem e edição dos cont Total:223
- 2 Redução de redundância das seqüências após serem alinhadas e aparadas com um mc Total:220
- 3 Resultado da Etapa 2-Considerando toda a porção disponível das seqüências com umz Total:129
- 4 Redução da redundancia considerando a região de interesse do mAB.Isto resultará no dataset final. Total:12

em vermelho: seqüências que foram excluídas do alinhamento inicial por não possuírem a região de atuação do mAB.





**AUTORIZAÇÃO PARA USO DE MATERIAL DE BIOREPOSITÓRIO DE  
ORIGEM HUMANA**

De acordo a Resolução nº 441/11, artigo 1º, item 15, venho informar que disponho de uma coleção de amostras de Aspirado de Nasofaringe, autorizada em 18 de Maio de 2016, que autorizo o uso do material para Pesquisa intitulada: **“ Avaliação de Mutações Evolutivas na Proteína F do Vírus Respiratório Sincicial (HRSV) com Potencial Resistência nos Epítomos de Ligação do Palivizumab (PZV) em Crianças sem Uso do PZV.”** sobre responsabilidade do pesquisador

Sr<sup>(a)</sup> Uirajan José da Silva.

Por outro lado, ressalto que o uso destas amostras é relevante para o estudo de:  
Dinâmica Evolutiva do Virus Sincicial Respiratório Humano

Garanto a confidencialidade da identidade dos pacientes dos quais não pretendemos estudar o material genético.

São Paulo, 15/10/2017

Prof. Dr. Edson Luiz Durigon

Responsável pela coleção: Prof. Dr. Edson Luiz Durigon

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas da USP

## ANEXO 2



**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE S PAULO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**  
 Rua Santa Isabel, 305 4º Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo – SP.  
 Tel.: (11) 2176-7689 E-mail: [eticamedbernadete@santacasasp.org.br](mailto:eticamedbernadete@santacasasp.org.br)

São Paulo, 28 de setembro de 2010.

**Projeto nº. 064/09**  
 Informe este número para  
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo. (a). Sr. (a).

**Dra. Giuliana Stravinskas Durigon**

Departamento de Pediatria

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em **reunião ordinária**, dia **25/03/09** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Vírus respiratórios: Características clínicas, epidemiológicas e meloculares em crianças com infecção respiratória aguda”** emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

**Aprovado (Inclusive TCLE);**

**Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendida em 60 dias, (enviar as alterações em duas cópias);

**Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

**Não aprovado:** e

**Aprovado (inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.** Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

  
 \_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Nelson Keiske Ono**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

JSC