

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

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*

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).

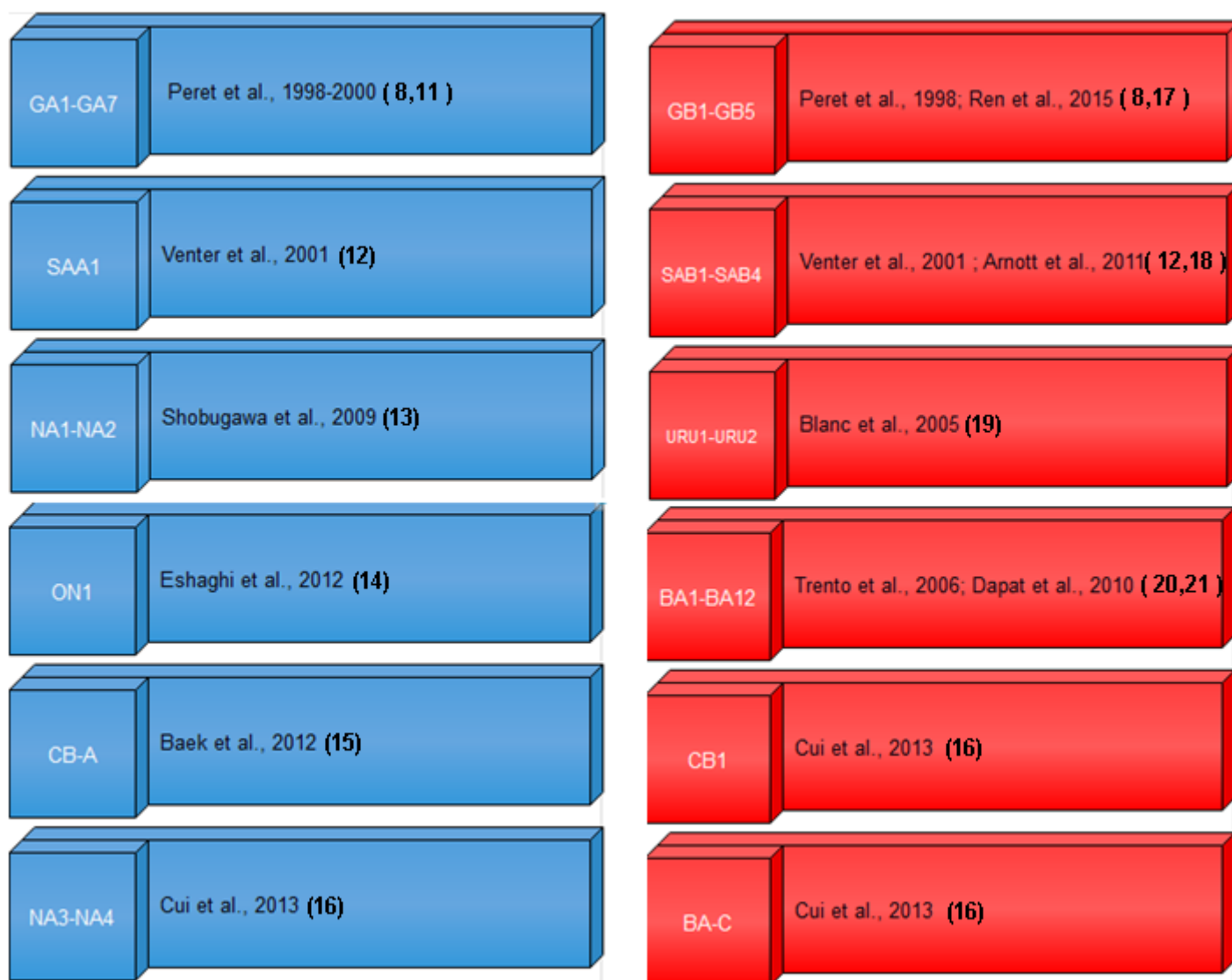
Em 1967 uma tentativa fracassada de imunização com uma vacina inativada por formalina resultou em uma infecção mais severa com febre alta, broncopneumonia e sibilância em crianças que receberam esta vacina e entraram em contato com a estirpe selvagem do HRSV (4). Segundo alguns autores, provavelmente 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 á 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

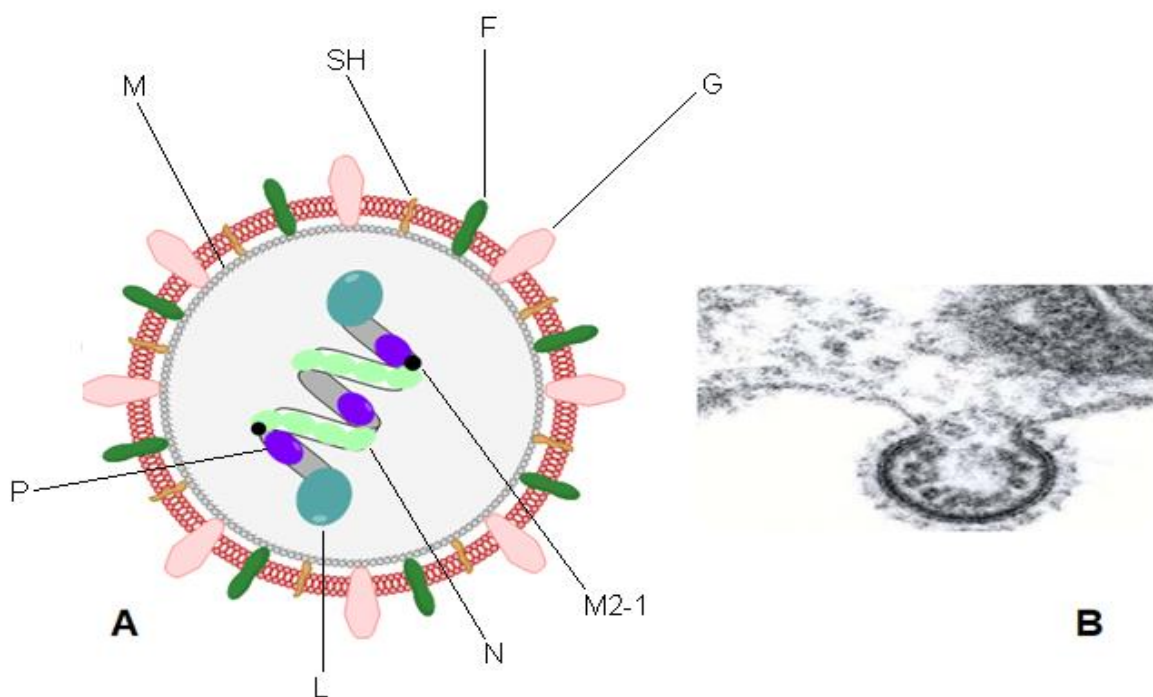
O HRSV pertence á ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae* e ao gênero *Orthopneumovirus* (10). Os subtipos do HRSV foram classificados em A e B de acordo com a divergência antigênica das proteínas G, F e N, e a partir da divergência de sequência de nucleotídeos dentro da segunda região hipervariável 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 filamentosa, 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

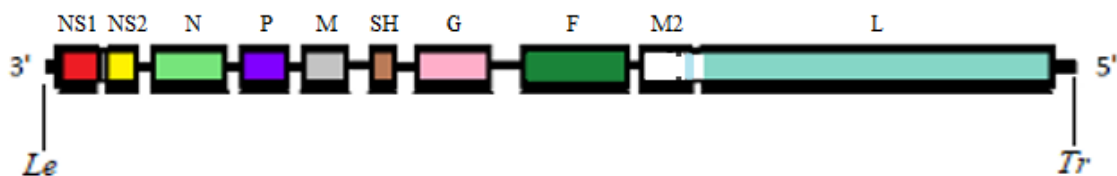
1.3 Genoma

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 * -CCCUGUUUA), 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)



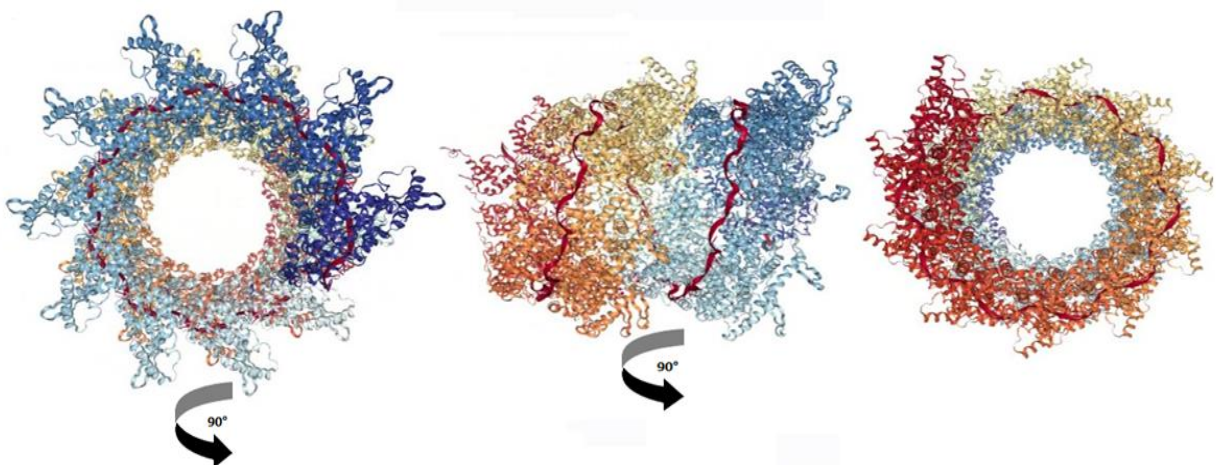
O gene NS2 codifica para uma proteína de 124 aminoácidos. Esta proteína não estrutural atua, assim como a NS1, bloqueando a sinalização de interferon e assim ocasiona a degradação de STAT2 (30,33). Também atua inibindo na maturação de células dendríticas assim como NS1 (34). Trabalhos recentes atribuíram 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 protegê-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 α), 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).

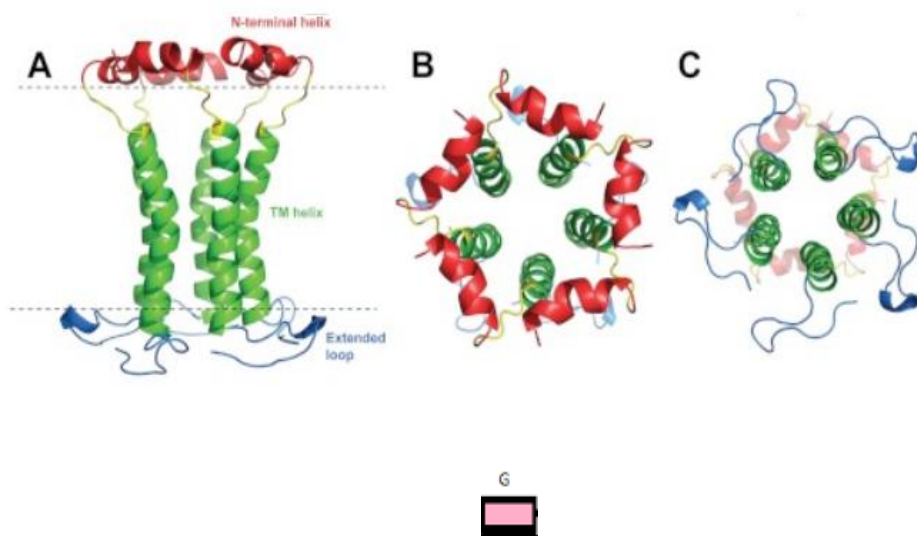
SH



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).

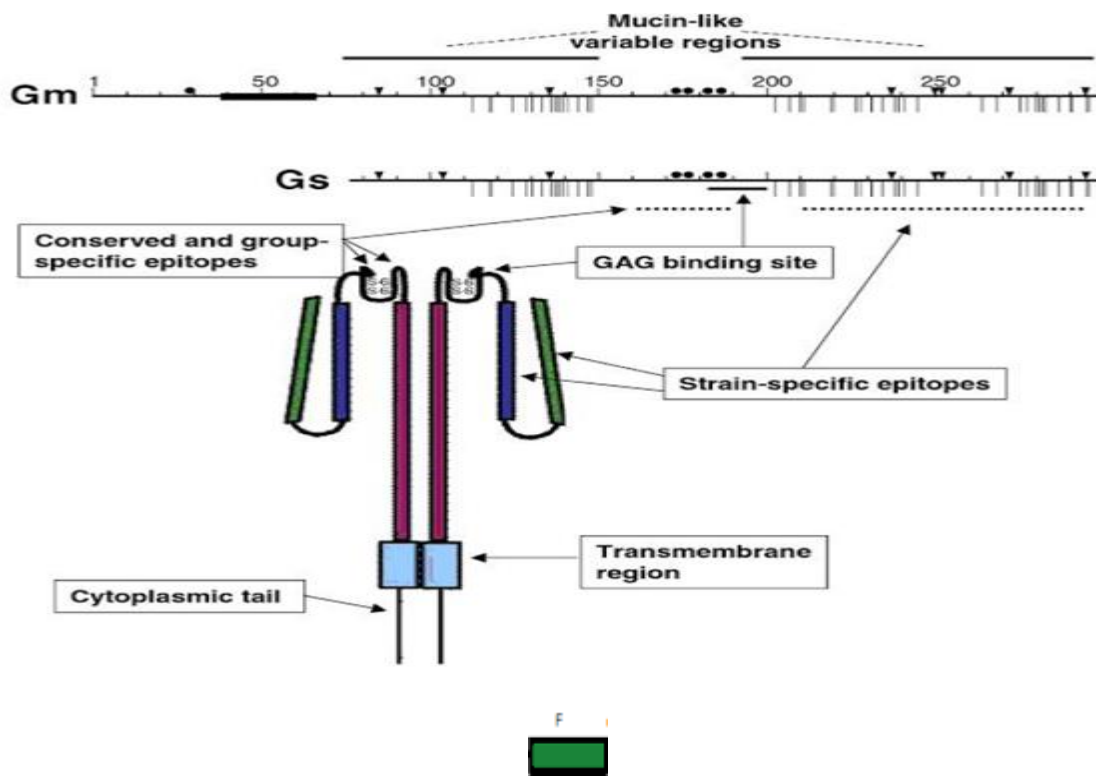
O papel da forma sG ainda é objeto de estudo. Porém alguns trabalhos já demonstraram que esta forma atua auxiliando o vírus a evadir a resposta imune do hospedeiro, realizando uma obstrução antigênica de modo a ocupar anticorpos neutralizantes, reduzir a atividade inflamatória além de inibir os efeitos 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 a 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

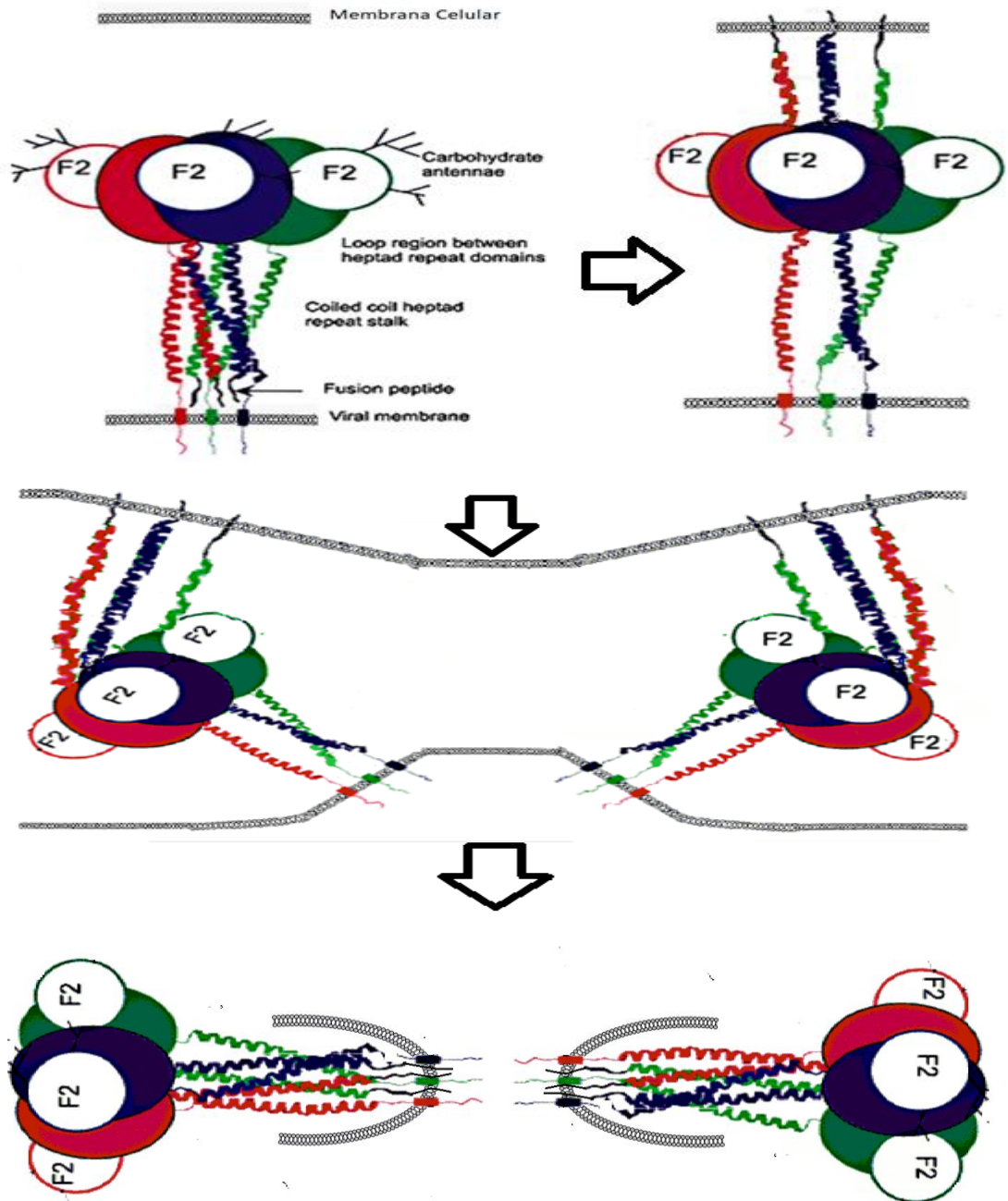
ou no local II, demonstrou ser essencial para a função de fusão e conseqüentemente formação dos sincícios, bem como a manutenção da integridade estrutural da proteína. Desta forma estes elementos imaturos são encontrados normalmente na superfície viral juntamente com as formas completamente processadas 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)



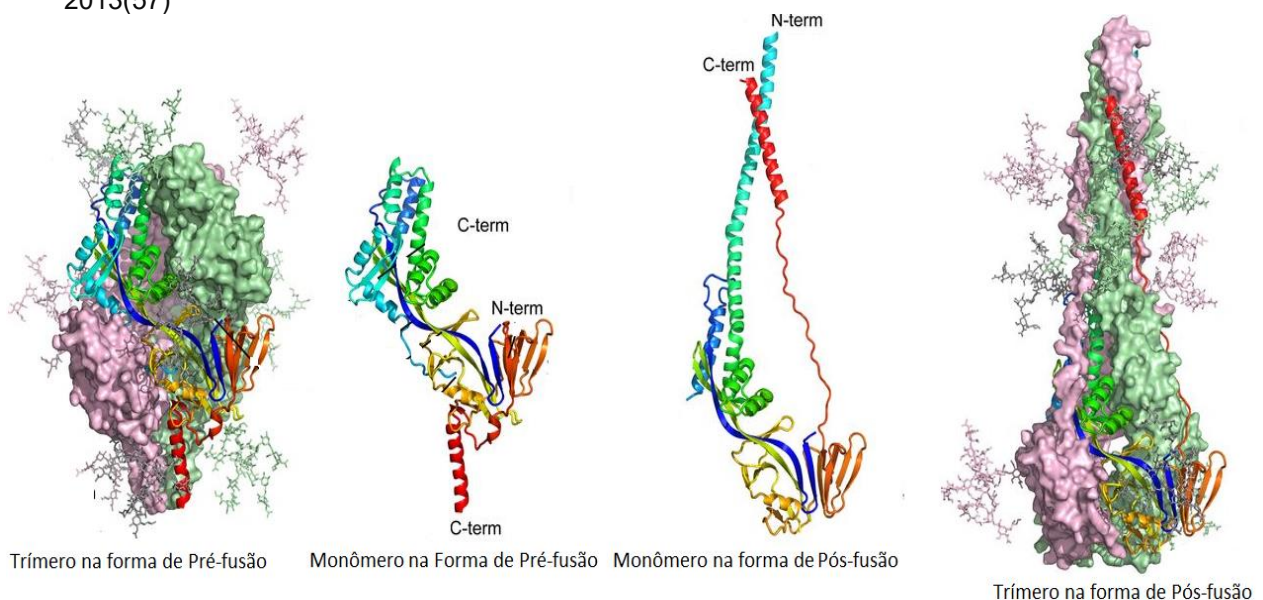
Low e colaboradores em 2008 sugeriram que as proteínas F e G interagem formando um complexo proteico no envelope viral, antecedendo o processo de fusão propriamente dito (79). Um dos fatos que reforçariam esta ideia seria que tanto a proteína G como a proteína F são capazes de interagir com o sulfato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

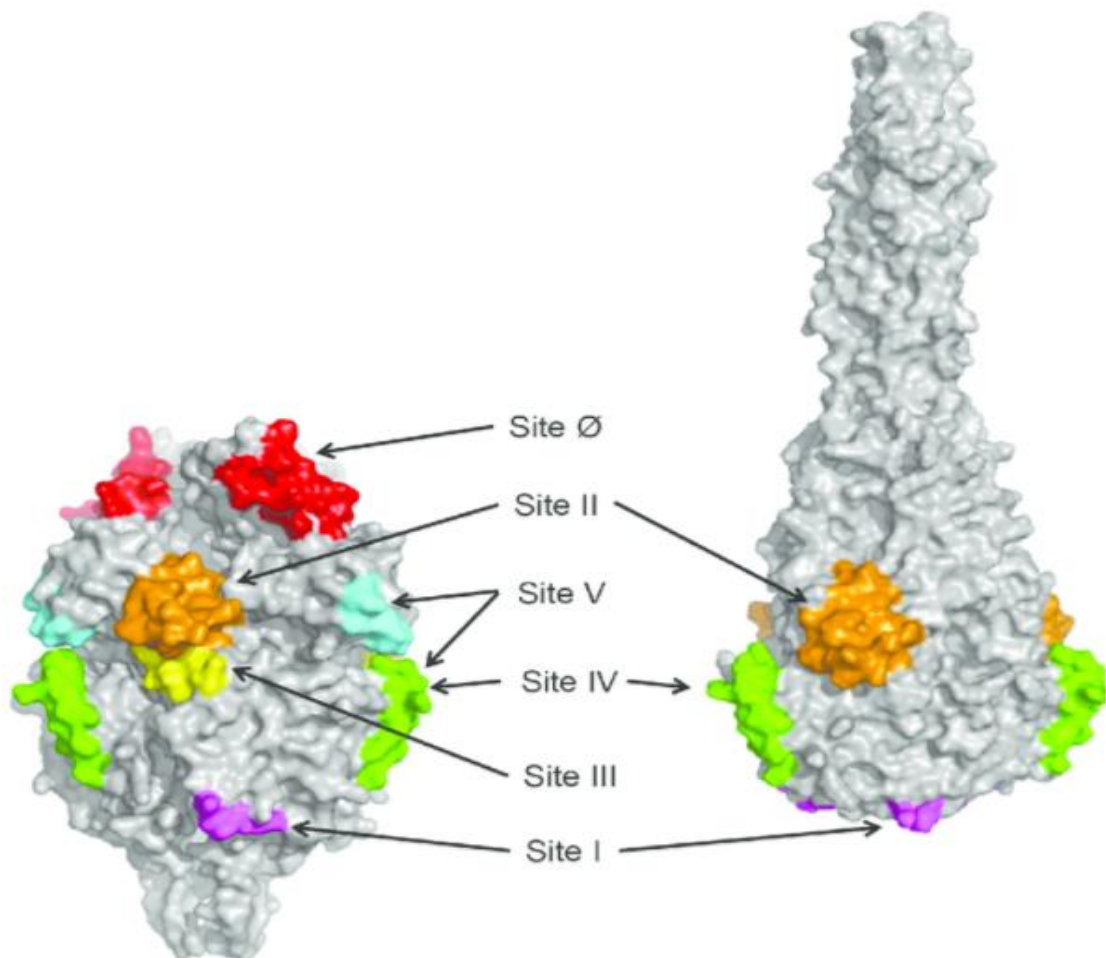


A proteína F juntamente com a proteína G possui características antigênicas de interesse no estudo da imunoprevenção por conter os epítomos alvos de anticorpos

neutralizantes (82,83). Beeler e colaboradores (84) e, posteriormente Arbiza e colaboradores (85) identificaram, mapearam e caracterizaram os epítopos e os sítios antigênicos em 1989 e 1992. Estes estudos mostraram que os anticorpos neutralizantes têm como alvo dois epítopos 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 antígenoma. 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 antígenoma, 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).



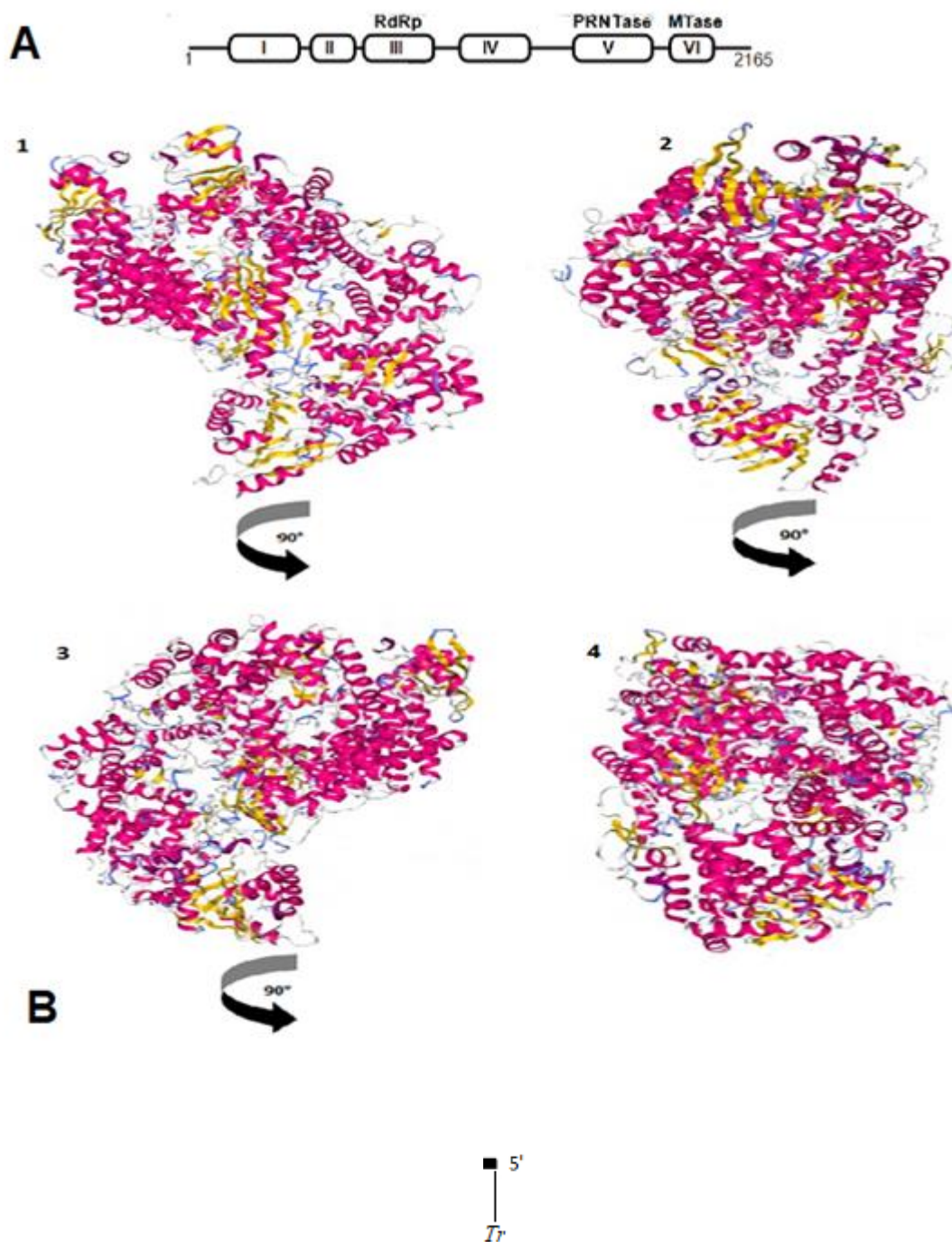
O gene L que possui uma sobreposição de 68 nucleotídeos com o gene M2, ou 45 nt mais a inclusão dos sinais de início de L (10 nt) e fim de gene de M2 (13 nt) (94,95,96). Este gene contém um único código de leitura aberto que codifica para uma proteína de 2165 aminoácidos, rica em Leucina e Isoleucina, 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

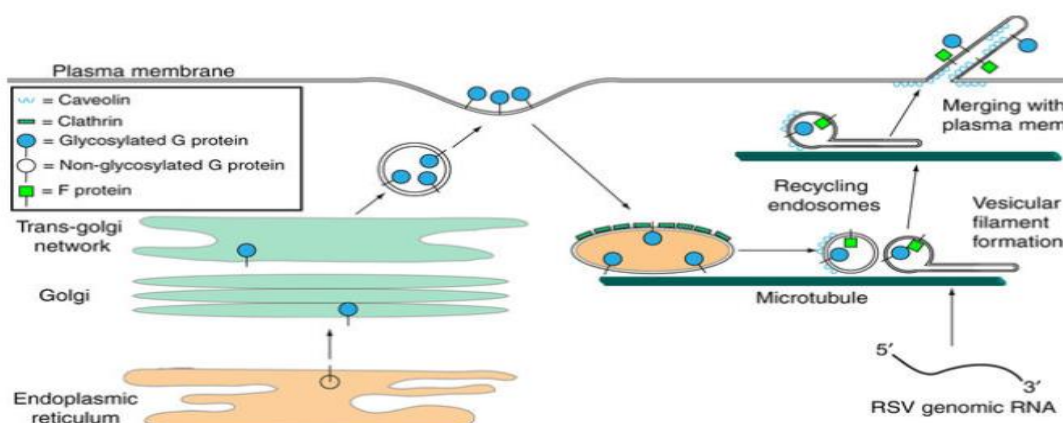
O ciclo infeccioso viral inicia-se com a entrada do mesmo nas células epiteliais ciliadas do aparato respiratório através da região apical destas (105). A entrada é possível primeiramente através da interação da Glicoproteína G com o receptor da célula hospedeira, os receptores de GAGS (Glicosaminoglicanos) 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 arojada 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 consequentemente 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 filamentososa 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).

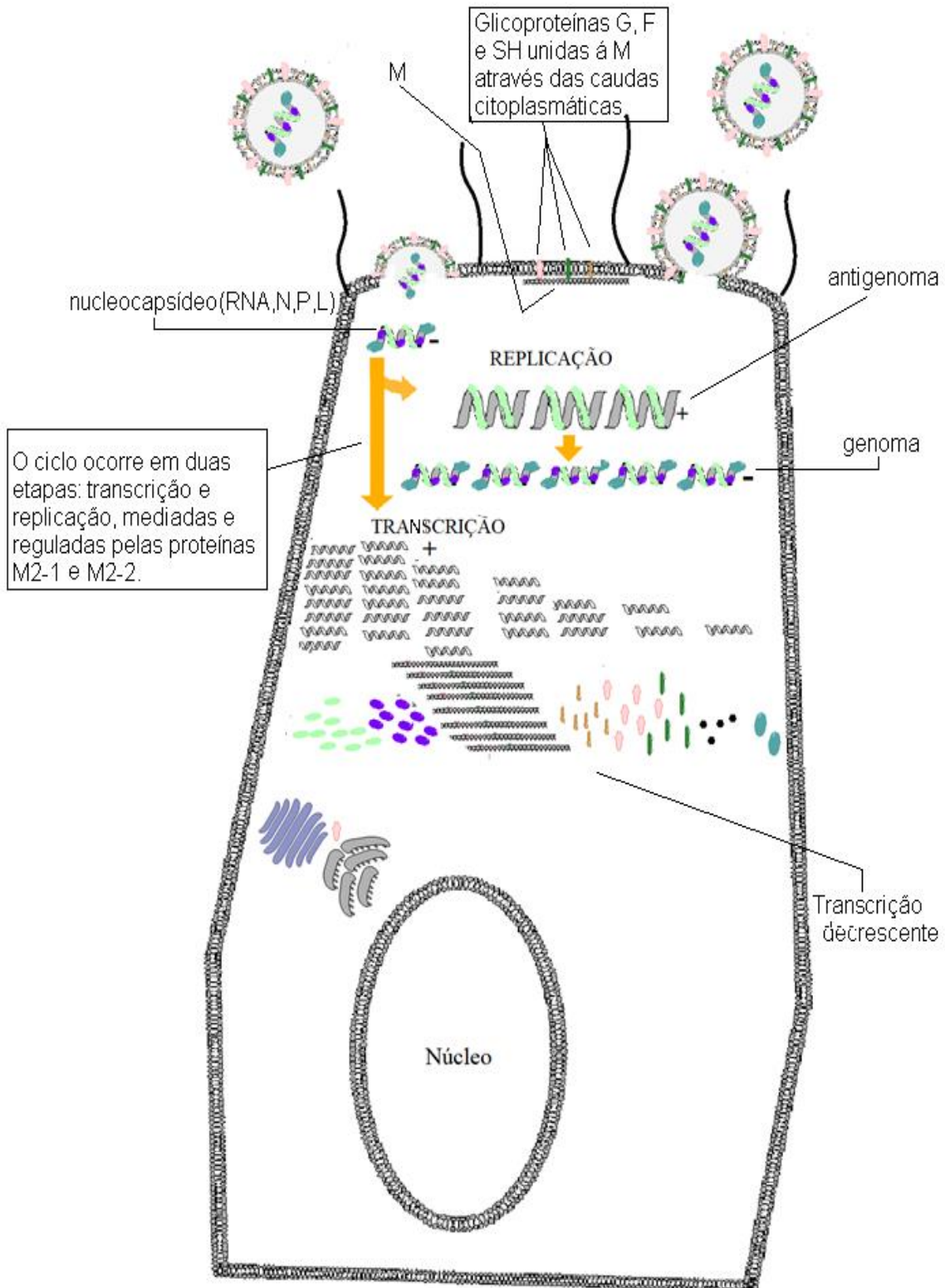
Figura 14 - Processo de formação das formas filamentosas (115)



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).

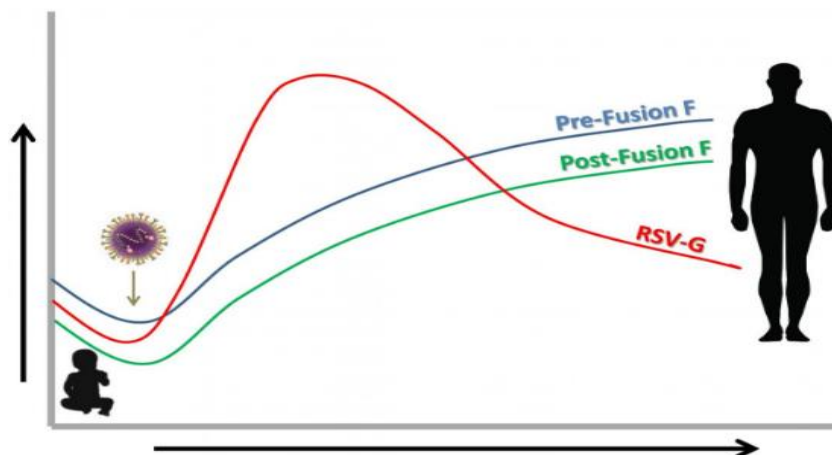
O HRSV é causador de até 75% dos casos de bronquiolite, e 40% das pneumonias durante o período de sazonalidade (126). Entre outros vírus causadores da patologia, podemos destacar o metapneumovírus humano (MPV), o adenovirus e o virus parainfluenza (121).

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).

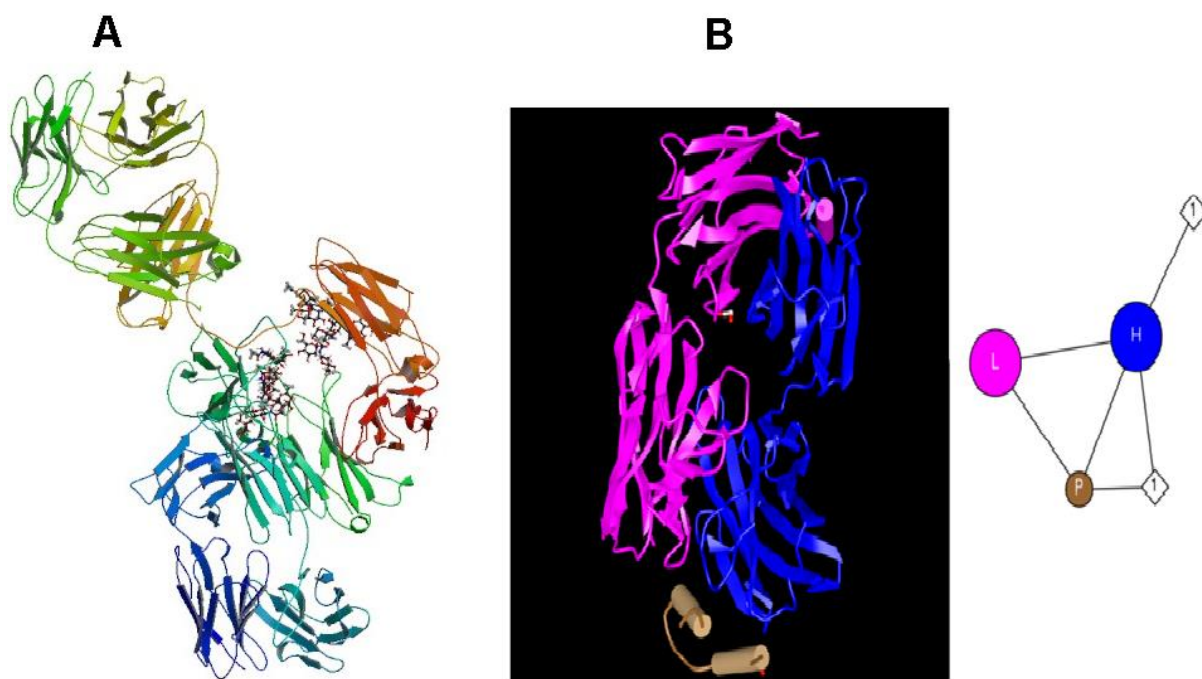
Atualmente não há vacina disponível contra o HRSV, embora hajam grandes esforços para o seu desenvolvimento, mas como citado acima, muitos fatores prejudicam o sucesso destes estudos. Uma vacina inativa com formalina foi testada em 1967, porém a mesma conduziu a uma infecção mais severa, quando os pacientes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

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

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 α (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>. 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>. 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/2016/04/160421145747.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>. 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

