

STELLA REZENDE MELO

Avaliação da susceptibilidade de mutantes de escape do vírus sincicial respiratório frente ao Palivizumab pelo método de microneutralização *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Edison Luiz Durigon

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

RESUMO

Melo S.R. Avaliação da susceptibilidade de mutantes de escape do vírus sincicial respiratório frente ao Palivizumab pelo método de microneutralização *in vitro*. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O Vírus Sincicial respiratório (HRSV) é um patógeno de grande importância para crianças. É o maior causador de infecções respiratórias agudas e também um dos principais causadores de internações e mortes de crianças menores de 5 anos. Cepas de HRSV com mutações no sítio de ligação do Palivizumab vêm apresentando resistência ao medicamento. Pouco se sabe sobre a prevalência destas mutações em amostras clínicas, apesar de sua potencial importância na patogênese viral. Além disso, existem poucos dados sobre a evolução molecular da proteína F do HRSV, sobretudo no Brasil. O presente estudo tem como objetivo caracterizar fenotipicamente através de ensaios de microneutralização *in vitro*, cepas oriundas de crianças não tratadas com Palivizumab circulantes em 2013 apresentando mutações na proteína F, mais especificamente relacionadas a potencial resistência nos epítomos de ligação do Palivizumab. Como resultado deste trabalho todas as amostras testadas foram neutralizadas pelo Palivizumab, concluindo-se que as mutações encontradas não conferem resistência ao monoclonal.

Palavras-chave: HRSV. Palivizumab. Microneutralização *in vitro*. Anticorpo monoclonal humanizado. Infecção respiratória aguda.

ABSTRACT

Melo S.R. Evaluation of the susceptibility of respiratory syncytial virus escape mutants to Palivizumab using “*in vitro*” microneutralization test. [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is an important pathogen for children. It is the major cause of acute respiratory infections and one of the main causes of hospitalizations and deaths in children under 5 years. Strains of HRSV with mutations in the binding site of Palivizumab have been showing resistance to the drug. Little is known about the prevalence of these mutations in clinical samples, despite their potential importance in viral pathology. In addition, there is almost no data on the molecular evolution of HRSV F protein, especially in Brazil. The aim of the present study is to characterize phenotypically by *in vitro* microneutralization assays, strains from children with no treatment with Palivizumab circulating in 2013 showing mutations in F protein, more specifically related to potential resistance in the binding epitopes of Palivizumab. As a result of this study all samples tested were neutralized by Palivizumab, concluding that the mutations found did not confer resistance to the monoclonal.

Keywords: HRSV. Palivizumab. *In Vitro* Microneutralization test. Humanized monoclonal antibody. Acute respiratory disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura Viral

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae*, gênero *Pneumovirus* (ICTV, 2017). Segundo Collins P.L., 2001, é um vírus pleomórfico, composto de nucleocapsídeo de simetria helicoidal, envelopado, que possui em seu genoma uma única fita de RNA de polaridade negativa. Seu envelope tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira, sendo, portanto, lipoprotéico.

O genoma do HRSV é formado por dez genes, os quais codificam onze proteínas (Gan et al., 2012). Os primeiros sete genes são traduzidos em proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e a RNA-polimerase-RNA-dependente (L), que encapsulam o RNA viral, formando o complexo ribonucleoprotéico (RNP). O complexo RNP, protege o material genético do vírus e forma uma maquinaria mínima, necessária para a sua replicação. O HRSV possui três proteínas de membrana: Glicoproteína (G) de adesão, proteína (F) de fusão e a proteína hidrofóbica curta (SH), que forma um canal iônico (Huang et al., 1985). Também é de responsabilidade de um desses sete primeiros genes a polimerização da proteína de Matriz (M), uma proteína associada à membrana. Esta proteína apresenta em ambos os domínios, N- e C-terminal uma grande área carregada positivamente que é importante para a ligação com a membrana citoplasmática. Essa grande área de carga positiva, é complementada por uma região hidrofóbica significativa, a qual provavelmente interaja com outros componentes virais (Money et al., 2009), Figura 1A.

Huang et. al., 1985 relata que no genoma do HRSV, também estão contidos três genes, que codificam duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e M2. NS1 e NS2 são antagonistas de Interferon tipo 1. Já M2 codifica 2 proteínas distintas, M2-1 e M22, que têm se mostrado funcionais na transcrição e replicação do genoma (Kiss et al., 2014) Figura 1B.

Figura 1 - Estrutura e Organização da Partícula Viral do HRSV

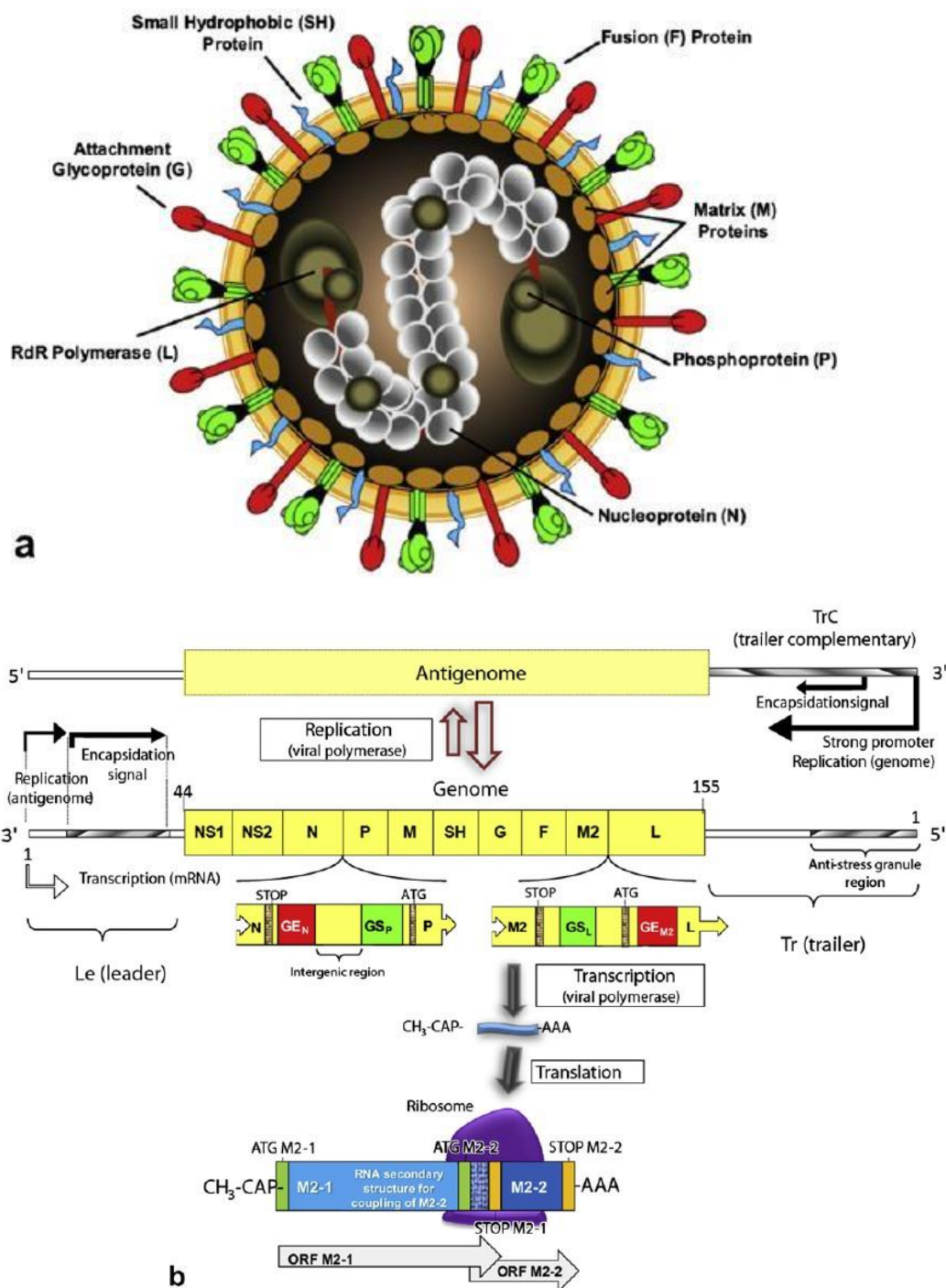


Figura 1 - Estrutura e Organização da Partícula Viral do HRSV. (a) Esquema representativo da partícula viral com demonstração do complexo RNP composto pela nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), RNA-polimerase-RNA-dependente (L) e as proteínas de membrana que são as glicoproteínas de adesão (G), fusão (F) e proteína hidrofóbica curta (SH) além da proteína de Matrix (M), que está associada ao envelope viral; **(b)** Esquema representativo da fita simples de RNA de polaridade negativa do HRSV (3' – 5') demonstrando todas as proteínas estruturais e não estruturais, suas posições no Genoma e o esquema de replicação viral. Fonte: (Lay et al. 2013)

1.2 Replicação Viral

O HRSV infecta as células epiteliais das vias respiratórias se ligando às glicosaminoglicanas (GAGs) da superfície celular, através de um domínio que supostamente se liga à heparina encontrada na proteína G (Lambert, 1988). A proteína (F) medeia a ligação do HRSV com a célula hospedeira, a fusão do envoltório viral com a membrana celular e promove a liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira, onde ocorre todo o processo de replicação do vírus (Collins et. al., 2001). A ligação da proteína G à célula hospedeira, permite que a proteína F se ligue à nucleolina, uma outra proteína presente na superfície da célula hospedeira, e se incorpore em microdomínios lipídicos ricos em colesterol nas microvilosidades e cílios na superfície apical da célula. Essas interações ativam a reorganização dos filamentos de actina, modificam o citoesqueleto e iniciam a hemifusão do envelope viral à membrana plasmática, permitindo a entrada do nucleocapsídeo do HRSV na célula hospedeira. Após essa hemifusão, o complexo RNP viral se dissocia da matrix e é liberado no citoplasma (Lay et al., 2013) Figura 2 A. No citoplasma, o complexo RNP inicia a transcrição dos genes virais necessários para a replicação. Há um aumento profuso da síntese de mRNA viral no início da infecção, particularmente, nos corpos de inclusão que se reúnem nas proteínas do complexo RNP (García et al., 1993).

Os genes do HRSV são transcritos na direção 3' – 5' e por seu genoma apresentar polaridade negativa, os mRNAs transcritos que codificam as proteínas virais são sintetizados diretamente do RNA genômico no citoplasma da célula hospedeira. No entanto, para a replicação do genoma viral é necessária a síntese de um antígenoma intermediário de RNA 5' – 3'. Este antígenoma é sintetizado a partir do genoma viral pela RNA polimerase. Tanto a transcrição dos mRNAs quanto a replicação do genoma, são regulados por um único promotor, localizado na região leader, na extremidade 3' do genoma viral (Mink et al., 1991). A enzima RNA polimerase RNA dependente se liga a região **leader** do genoma e dá início à transcrição do primeiro nucleotídeo (Collins et. al., 2001). Na junção entre a região **leader** e o primeiro gene, o mRNA transcrito é liberado e a polimerase recomeça a transcrição (Collins et. al., 2001). Os genes virais são flanqueados por sinais de início do gene (GS) e final do gene (GE), que são reconhecidos pela RNA-polimerase-RNA-dependente, que adiciona um *cap* na ponta 5' (GS) da cadeia nascente e são poliadenilados e liberados

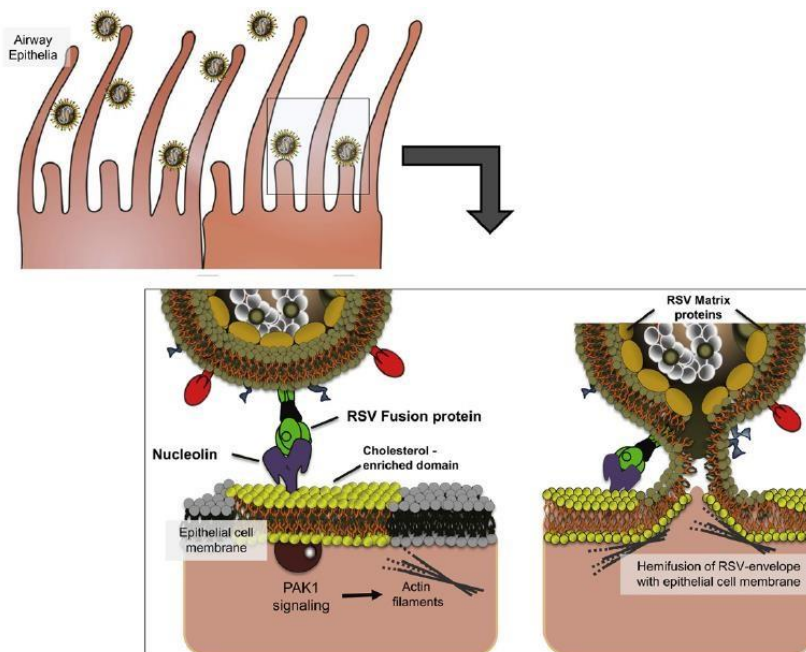
na ponta 3' (GE) (Collins, Wertz 1985). Nesta etapa, a proteína anti-terminação M2-1 previne a liberação concomitante da RNA-polimerase-RNA-dependente, que promove a transcrição dos mRNAs ao invés da replicação do genoma (Hardy, Wertz, 1998). Além dos mRNAs produzidos, também pode ser encontrada uma pequena quantidade de grandes mRNAs poliadenilados, que ocorrem devido à transcrição contínua de 2 ou mais genes. Estes fragmentos apresentam tanto a sequência dos genes quanto a sequência da região intergênica. Suspeita-se que a polimerase falha no reconhecimento de final do gene e continua sintetizando o mRNA até encontrar o próximo sinal de final do gene (Collins et. al., 2001). Quando os mRNAs se acumulam a uma certa quantidade no citoplasma da célula hospedeira, o complexo RNP pára de transcrever e replicar o mRNA, de polaridade negativa, e passa a produzir o antígenoma viral, que consiste em uma fita de RNA de polaridade positiva e que contém o genoma viral completo, o qual servirá de molde para formar o RNA viral de polaridade negativa (Murray et. al., 2009). Para que a síntese do antígenoma ocorra, é necessário que a maquinaria de produção de RNA entre em modo de “anti-terminação” e passe a ignorar todos os sinais de início e fim dos genes, inclusive entre a região leader e o gene NS1 (Collins et. al. 2001). Segundo Ghildyal et. al. (2005), a proteína M apresenta uma via de importação nuclear. No início da infecção, esta proteína é transportada para o núcleo da célula, onde desempenha algum papel, possivelmente, ligado a algum processo nuclear específico da célula hospedeira, como transcrição ou associação de ribossomos. Num período mais avançado da infecção, a proteína M se redireciona para o citoplasma. Esse redirecionamento é necessário para a produção de grandes quantidades de vírus e aparenta ser mediado pela fosforilação da proteína M (Ghildyal, et al. 2005).

O primeiro passo para a maturação do vírus é montagem do nucleocapsídeo, que acontece pela combinação da proteína N com o RNA genômico, seguido da adição das proteínas P e L (Collins et. al. 2001). As glicoproteínas de envelope, G e F, são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático, posteriormente processadas no Golgi e transportadas para a membrana citoplasmática. A proteína F também recruta outras proteínas virais, como a glicoproteína G para a formação de um complexo na superfície da célula infectada. Ocorre também a interação da cauda citoplasmática da proteína G com a proteína M, vinculando as proteínas de superfície F, SH e G com a matrix viral. No interior da partícula viral, a proteína M parece se ligar à proteína M2-1 no complexo RNP, recrutando essa estrutura para a membrana

celular, para que haja a montagem do vírus (Li, et al. 2008). A montagem do envelope se dá com as glicoproteínas virais, modificadas por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e complexo de golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares da membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Finalmente, o nucleocapsídeo alcança a superfície e o brotamento da partícula viral ocorre pela superfície apical, através da via endossomal de reciclagem, sendo este um mecanismo ainda não descrito para nenhum vírus envelopado de RNA. Este mecanismo de brotamento, também é independente dos complexos endossomais de distribuição requeridos para transporte (ESCRT), o principal mecanismo de brotamento para vírus de RNA de sentido negativo (Lay et al., 2013). Ao brotar, o vírion leva consigo uma porção da membrana plasmática da célula hospedeira, num processo inverso ao da penetração por fusão (Collins et. al. 2001). Os antígenos virais podem ser detectados 9h após infecção em cultura celular e o vírus infeccioso entre 11 e 13 horas (Ogra, 2004).

Figura 2 - Replicação do HRSV.

A



B

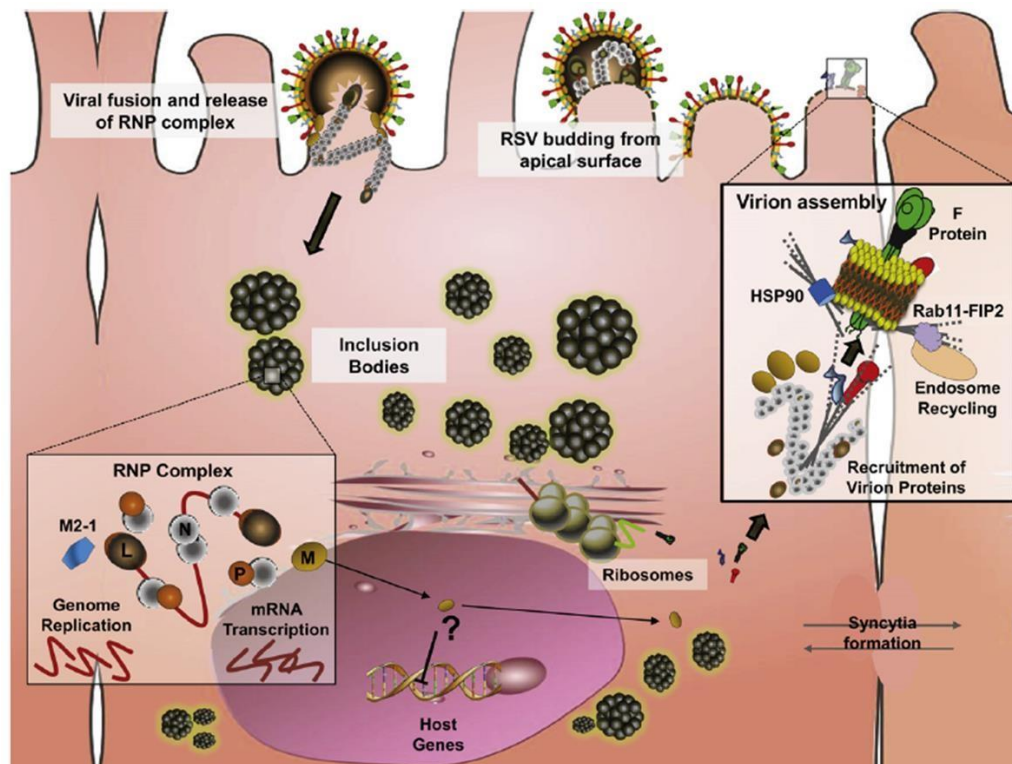


Figura 2 - Replicação do HRSV. (A) Representação esquemática da entrada do HRSV na célula hospedeira. A proteína de adesão G faz a ligação primária com a superfície celular e permite que ocorra a ligação da proteína F com a proteína nucleolina; (B) Representação da transcrição, tradução e brotamento dos dos virions. Fonte:(Lay et al. 2013).

1.3 Proteína F

A glicoproteína F é uma proteína integral da membrana viral, altamente conservada e apresenta peso molecular de aproximadamente 68.000 Kb (Collins, Wertz, 1985). É responsável pela fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. Também é encontrada na superfície de células infectadas, sendo responsável por sua fusão e consequente formação de sincício. Portanto, anticorpos contra esta proteína podem neutralizar diretamente o vírus ou bloquear sua entrada na célula ou ainda impedir a formação de sincícios (Johnson et al., 1997). A proteína F é bem conservada em todas as variantes do HRSV, sendo assim um alvo importante para o desenvolvimento de anticorpo monoclonal (Pollack, Groothuis, 2002).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo (F0) composto por 574 aminoácidos (Collins et al., 1984). Monômeros de F0 se juntam formando trímeros, que ao passar pelo complexo de Golgi vão sendo ativados por proteases do hospedeiro (Collins, Mottet, 1991). As proteases clivam F0 em duas subunidades, dando origem à F1 e F2, que são ligadas entre elas covalentemente (Zimmer et al., 2001a). A subunidade F1 é fundamental para a fusão das membranas e formação de sincício (Zimmer et al., 2001b). Dentro da subunidade F1 foram mapeados 5 sítios antigênicos conhecidos por I, II, IV, V e VI, sendo o sítio antigênico II da proteína F o que carrega o epítopo de ligação do Palivizumab (Zhao et al., 2004).

1.4 Epidemiologia e Patogenia

Em países em desenvolvimento, as principais causas de morbidade e mortalidade são as infecções respiratórias agudas. Nesses países a severidade, incidência e quantidade de casos fatais também são maiores. Uma das principais causas de infecção respiratória aguda são os vírus respiratórios (Arruda et al., 1991). Dentre os vírus respiratórios, o HRSV é um dos principais patógenos pediátricos e também vem se mostrando de grande importância em pacientes idosos e imunocomprometidos (Bates et al., 2014). Em um recente estudo epidemiológico global, foi estimado que em 2015 houveram aproximadamente 33,1 milhões de casos de infecção respiratória aguda por HRSV. Dentre estes casos, para 3,2 milhões foram necessárias internações hospitalares e 59.600 resultaram em mortes de crianças internadas menores de 5 anos de idade. Neste mesmo

período, para crianças menores de 6 meses de idade, foi estimado 1,4 milhões de internações hospitalares, sendo que destas, uma média de 27.300 resultaram na morte das crianças, com grande número ocorrendo próximo ao período neonatal, quando o HRSV se apresenta como apneia ou sepse. Este mesmo estudo ainda relata que devido a fatores como casos não relatados e amostras não testadas estes números podem estar subestimados (Shi et al., 2017).

O HRSV é uma importante causa de internação e morte de crianças em todo o mundo. Seu sintoma clínico e a sua severidade podem variar de acordo com a idade da criança. Normalmente a primeira infecção acontece entre as primeiras 6 semanas de vida e os 2 anos de idade e raramente são assintomáticas. As recidivas durante a vida são comuns, porém tendem a não ser severas (Ogra, 2004).

A população com maior predisposição a desenvolver doença severa resultante da infecção por HRSV são os neonatos, lactentes, crianças nascidas prematuras, com doenças pulmonares crônicas ou cardiopatias congênitas e imunodeficientes (Zhu et al., 2011).

A infecção por HRSV causa doença do trato respiratório inferior em crianças, podendo ocasionar bronquiolite aguda e pneumonia. Os principais sintomas são taquipneia e dispneia, tosse severa e chiado respiratório que podem ser tão fortes a ponto de se assemelharem a ataques de asma, em casos mais severos pode ocorrer hipóxia, podendo ser observada cianose (Ismail, Reisner, 2001; Lay et al., 2013). Outros sintomas bastante comuns são traqueobronquite ou doença do trato respiratório superior, normalmente acompanhadas por febre e otite média (Ismail, Reisner, 2001).

O HRSV é um vírus sazonal, tendo maior incidência de infecções nas estações frias de climas temperados e em climas tropicais, quando o clima esfria e aumentam as chuvas (Simoës, 1999).

1.5 Profilaxia e Tratamento

O Palivizumab, a única profilaxia aprovada pela FDA (do Inglês - Food and Drug Administration) contra infecção por HRSV (Shadman, Wald, 2011) é um anticorpo IgG monoclonal neutralizante humanizado que se liga no sítio antigênico A, uma região altamente conservada na proteína de fusão F do HRSV, localizada entre os aminoácidos 258 e 275 (Zhu et al., 2011a), impedindo, dessa forma que o vírus entre

na célula hospedeira, e conseqüentemente, prevenindo ou reduzindo a severidade da infecção (Murray et al., 2014). De acordo com Collins e Melero, 2011, “Este produto não necessariamente previne a infecção por HRSV, mas consegue restringir a replicação o suficiente para reduzir a doença”.

O Palivizumab é administrado por via intramuscular, na dose de 15 mg/Kg. A aplicação é realizada mensalmente, durante 5 meses, sendo a primeira feita antes do início da temporada de HRSV. Como a imunidade oferecida pelo medicamento é apenas parcial, há a necessidade de reforço mensal, durante todo o período de prevalência do HRSV (Robinson et al., 2013).

Assim como a grande maioria dos vírus de RNA, o HRSV também é altamente mutável, devido à baixa capacidade da RNA-polimerase-RNA-dependente de fazer reparos. Isso faz com que o HRSV seja bastante adaptável às pressões seletivas e proporcionando assim o aparecimento de quasiespécies (Zhao et al., 2004). As quasiespécies naturais de vírus de RNA permitem a emergência rápida de vírus mutantes que escapam da pressão imune do hospedeiro frente a este monoclonal (Moraes et al., 2015). Trabalhos prévios demonstraram que mutações nos aminoácidos S268I, K272Q, K272E, S275L e N276S já existem na população e podem propiciar pacientes com recidivas (Zhu et al., 2011; Papenburg et al., 2012; Tomé et al., 2012; Oliveira et al., 2015). A subunidade F₁ é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante estas deleções ou substituições de aminoácidos (Collins et al., 2001, Tomé et al., 2012).

No entanto, pouco se sabe sobre a prevalência de tais mutações em amostras clínicas no mundo todo. Além disso, apesar do seu papel em estratégias de patogenia, imunidade e prevenção do HRSV, poucos dados sobre a evolução molecular da proteína F do HRSV estão disponíveis, sobretudo no Brasil, porque os estudos filogenéticos anteriores concentraram-se na glicoproteína G do HRSV.

Portanto, nosso trabalho tem como objetivo, em relação ao HRSV, caracterizar fenotipicamente por microneutralização, amostras de diferentes genótipos circulantes em 2013, que possuem alguma mutação na proteína F, porção parcial F₁ (262 ` a 276 Aa), particularmente mutações de potencial resistência nos epítomos de ligação do Palivizumab (N268, K272, S275 para os dois tipos de HRSV e N276 para o HRSV-A e S276 para o HRSV-B), de cepas oriundas de crianças que não fizeram uso do Palivizumab.

2 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstra que no Brasil o uso do Palivizumab ainda é uma opção na profilaxia e tratamento de IRA em crianças com doenças de base e com risco de morte por infecção causadas por HRSV, devido não haver a ocorrência de cepas resistentes fenotipicamente a este monoclonal humanizado até o momento.

REFERÊNCIAS*

Adams O, Bonzel L, Kovacevic A, Mayatepek E, Hoehn T, Vogel M. Palivizumab Resistant Human Respiratory Syncytial Virus Infection in Infancy. *Clin Infect Dis* 2010;51:185–8. doi:10.1086/653534.

Arruda E De, Hayden FG, Mcauliffe JF, De MA, Mota SB, Mcauliffe MI, et al. Acute Respiratory Viral Infections in Ambulatory Children of Urban Northeast Brazil
Published by: Oxford University Press Stable URL :
<http://www.jstor.org/stable/30111895> Acute Respiratory Viral Infections in Ambulatory Children of Urban Northeast Brazi 1991;164:252–8.

Bates JT, Keefer CJ, Slaughter JC, Kulp DW, Schief WR, Crowe JE. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology* 2014;454–455:139–44. doi:10.1016/j.virol.2014.02.010.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Internet]. Atlanta:Centers for Disease Control and Prevention; c2017 [update 2017 march; cited 2017 oct 05]. Available from: <https://www.cdc.gov/rsv/research/us-surveillance.html>

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

Collins PL, McIntosh K, Chanock RM. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res* 2011;162:80–99. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.020.

Collins PL, Mottet G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1991;72 (Pt 12):3095–101.

Collins PL, Wertz GW. The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide sequence of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* 1985;54:65–71.

Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, Kumaki A, Zaraket H, Dapat C, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(9):3423-7. doi: 10.1128/JCM.00646-10.Epub2010Jul7

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, 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* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0032807.

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, Peret TC, Dare RK, Sawatwong P, Thamthitiwat S, Areerat P, Sanasuttipun W, Fischer J, Maloney SA, Erdman DD, Olsen SJ, The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand, *PLoS ONE* 5 (2010) e15098.

Gan S-W, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GM-Y, et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem* 2012;287:24671–89. doi:10.1074/jbc.M111.332791.

García J, Barreno BG, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic Inclusions of Respiratory Syncytial Virus-Infected Cells: Formation of Inclusions Bodies in Transfected Cells That Coexpress the Nucleoprotein, the Phosphoprotein, and the 22K Protein. *Virology* 1993; 195: 243-7.

Ghildyal R, Ho A, Wagstaff KM, Dias MM, Barton CL, Jans P, et al. Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin β 1 Independent of Importin α . *Biochemistry* 2005;44:12887–95. doi:10.1021/bi050701e.

Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *J Infect Dis* 2006;193:54–8. doi:10.1086/498526.

Hardy RW, Wertz GW. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* 1998;72:520–6.

Huang YT, Collins PL, Wertz GW. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: Identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res* 1985;2:157–73. doi:10.1016/0168-1702(85)90246-1.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Virus Taxonomy: 2017*. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negativesense-rna-viruses/w/pneumoviridae. Acesso em: 05 de outubro. 2017.

Ismail N, Reisner B. Update on Human Respiratory Syncytial Virus. *Clin Microbiology Newsl* 2001;23:91–7.

Johnson S, Oliver C, Prince G a, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC, et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1997;176:1215–24. doi:10.1086/514115.

Kiss G, Holl JM, Williams GM, Alonas E, Vanover D, Lifland AW, et al. Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 Between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex. *J Virol* 2014;88:7602–17.

doi:10.1128/JVI.00256-14.

Lambert DM. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology* 1988;164:458–66. doi:10.1016/00426822(88)90560-0.

Lay MK, González PA, León MA, Céspedes PF, Bueno SM, Riedel CA, et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes Infect* 2013;15:230–42. doi:10.1016/j.micinf.2012.11.012.

Li D, Jans DA, Bardin PG, Meanger J, Mills J, Ghildyal R, et al. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *J Virol* 2008;82:8863–70. doi:10.1128/JVI.00343-08.

Mink MA, Stec DS, Collins PL. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 1991;185:615–24. doi:10.1016/0042-6822(91)90532-G.

Money V a, McPhee HK, Mosely J a, Sanderson JM, Yeo RP. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4441–6. doi:10.1073/pnas.0805740106.

Monteiro AIMP, Bellei NCJ, Sousa AR, dos Santos AMN, Weckx LY. Infecções Respiratórias Em Crianças Menores De Dois Anos De Idade Submetidas a Profilaxia Com Palivizumabe. *Rev Paul Pediatr* 2014;32:152–8. doi:10.1590/01030582201432214813.

Moraes CTP, Oliveira DBL, Campos ACA, Bosso PA, Lima HN, Stewien KE, et al. Genetic variability in G2 and F2 region between biological clones of human respiratory syncytial virus with or without host immune selection pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;0:00–00. doi:10.1590/0074-02760140299.

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1985;66 (Pt 10:2111–24. doi:10.1099/0022-1317-66-102111.

Murray J, Saxena S, Sharland M. Preventing severe respiratory syncytial virus disease: passive, active immunisation and new antivirals. *Arch Dis Child* 2014;99:469– 73. doi:10.1136/archdischild-2013-303764.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 2004;5. doi:10.1016/S1526-0542(04)90023-1.

Oliveira, Danielle Bruna Leal Edi Durigon EL, Carvalho ACL, Leal AL, Souza TS, Thomazelli LM, Moraes CTP, et al. Epidemiology and Genetic Variability of Human Metapneumovirus During a 4-Year-Long Study in Southeastern Brazil. *J Med Virol* 2009;81:915–21. doi:10.1002/jmv.

Oliveira DBL, Iwane MK, Prill MM, Weinberg G a., Williams J V., Griffin MR, et al. Molecular characterization of respiratory syncytial viruses infecting children reported to have received palivizumab immunoprophylaxis. *J Clin Virol* 2015;65:26–31. doi:10.1016/j.jcv.2015.01.016.

- Panayiotou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010–2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiol Infect* 2014;142:2406–11. doi:10.1017/S0950268814000028.
- Papenburg J, Carbonneau J, Hamelin M-È, Isabel S, Bouhy X, Ouhoumanne N, et al. Molecular Evolution of Respiratory Syncytial Virus Fusion Gene, Canada, 2006–2010. *Emerg Infect Dis* 2012;18:120–4. doi:10.3201/eid1801.110515.
- Pierangeli A, Trotta D, Scagnolari C, Ferreri ML, Nicolai A, Midulla F, et al. Rapid spread of the novel respiratory syncytial virus a on1 genotype, central Italy, 2011 to 2013. *Eurosurveillance* 2014;19:1–10. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.26.20843.
- Pollack P, Groothuis JR. Development and use of palivizumab (Synagis): A passive immunoprophylactic agent for RSV. *J Infect Chemother* 2002;8:201–6. doi:10.1007/s10156-002-0178-6.
- Robinson K a, Odelola O a, Saldanha IJ, Mckoy N a. Palivizumab for prophylaxis against respiratory syncytial virus infection in children with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013. doi:10.1002/14651858.CD007743.pub4.
- Sato M., Saito R., Sakai T., Sano Y., Nishikawa M., *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microb* 43: 36–40, 2005.
- Shadman K a, Wald ER. A review of palivizumab and emerging therapies for respiratory syncytial virus. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11:1455–67.
- Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015. *Lancet* 2017;In Press:1–13. doi:10.1016/S0140-6736(17)30938-8.
- Simoes EAF. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* 1999;354:847. doi:10.1016/S0140-6736(99)80040-3.
- Sullender WM. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:1–15. doi:10.1128/CMR.13.1.1-15.2000.
- Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0109191.
- Tomé L, Frabasile S, Candia C, Pittini A, Farina N, Melero JA, et al. Selection and characterization of human respiratory syncytial virus escape mutants resistant to a polyclonal antiserum raised against the F protein. *Arch Virol* 2012;157:1071–80. doi:10.1007/s00705-012-1274-2.

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

Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, Durigon EL. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3459785. doi: 10.1155/2017/3459785.

Xia Q, Zhou L, Peng C, Hao R, Ni K, Zang N, et al. Detection of respiratory syncytial virus fusion protein variants between 2009 and 2012 in China. *Arch Virol* 2014;159:1089–98. doi:10.1007/s00705-013-1870-9.

Zhao X, Chen F-P, Megaw AG, Sullender WM. Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants. *J Infect Dis* 2004;190:1941–6. doi:JID32724 [pii] 10.1086/425515 ET - 2004/11/06.

Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J Infect Dis* 2011a;203:674–82. doi:10.1093/infdis/jiq100.

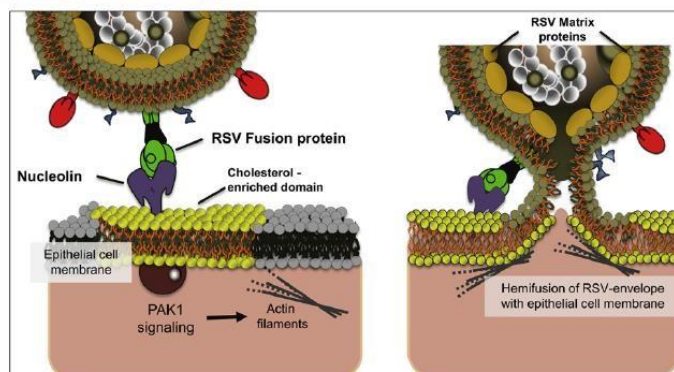
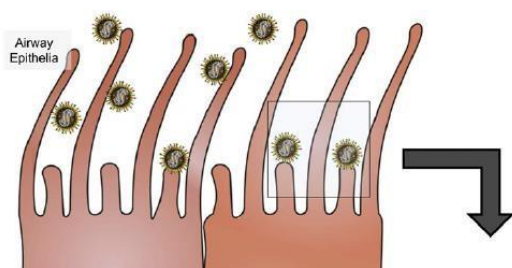
Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J Infect Dis* 2011b;203:674–82. doi:10.1093/infdis/jiq100.

Zimmer G, Budz L, Herrler G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* 2001a;276:31642–50. doi:10.1074/jbc.M102633200.

Zimmer G, Trotz INA, Herrler G. N-Glycans of F Protein Differentially Affect Fusion Activity of Human Respiratory Syncytial Virus 2001b;75:4744–51. doi:10.1128/JVI.75.10.4744.

Figura 2 - Replicação do HRSV.

A



B

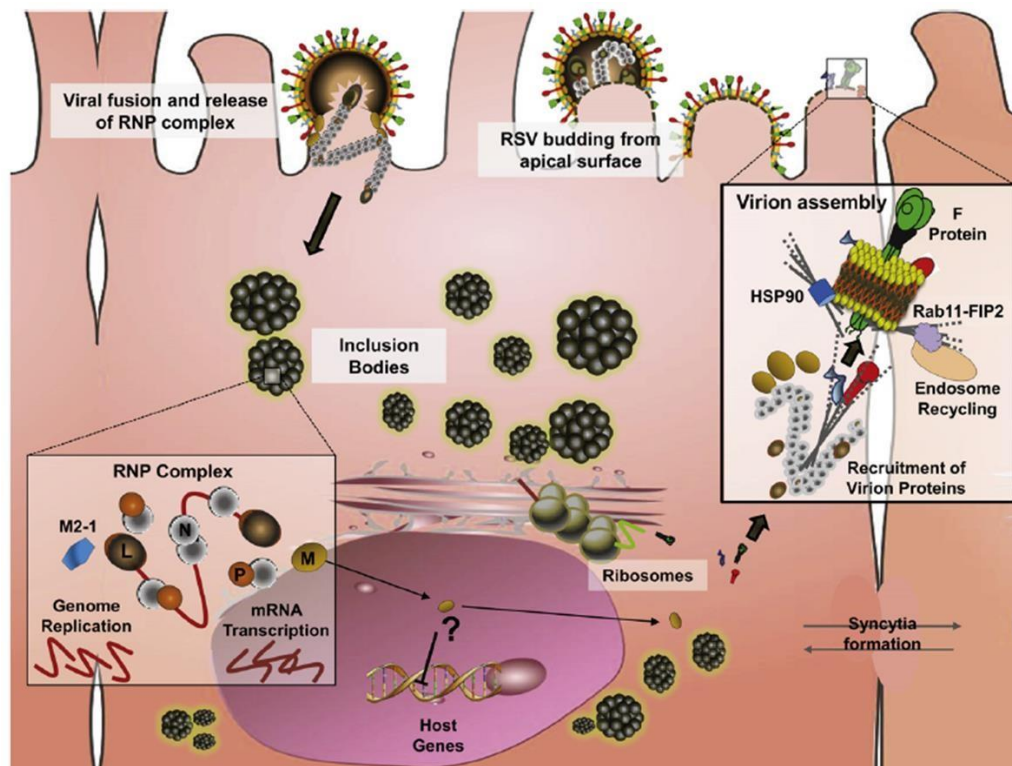


Figura 3 - Replicação do HRSV. (A) Representação esquemática da entrada do HRSV na célula hospedeira. A proteína de adesão G faz a ligação primária com a superfície celular e permite que ocorra a ligação da proteína F com a proteína nucleolina; (B) Representação da transcrição, tradução e brotamento dos dos viriões. Fonte:(Lay et al. 2013).

1.6 Proteína F

A glicoproteína F é uma proteína integral da membrana viral, altamente conservada e apresenta peso molecular de aproximadamente 68.000 Kb (Collins, Wertz, 1985). É responsável pela fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. Também é encontrada na superfície de células infectadas, sendo responsável por sua fusão e consequente formação de sincício. Portanto, anticorpos contra esta proteína podem neutralizar diretamente o vírus ou bloquear sua entrada na célula ou ainda impedir a formação de sincícios (Johnson et al., 1997). A proteína F é bem conservada em todas as variantes do HRSV, sendo assim um alvo importante para o desenvolvimento de anticorpo monoclonal (Pollack, Groothuis, 2002).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo (F0) composto por 574 aminoácidos (Collins et al., 1984). Monômeros de F0 se juntam formando trímeros, que ao passar pelo complexo de Golgi vão sendo ativados por proteases do hospedeiro (Collins, Mottet, 1991). As proteases clivam F0 em duas subunidades, dando origem à F1 e F2, que são ligadas entre elas covalentemente (Zimmer et al., 2001a). A subunidade F1 é fundamental para a fusão das membranas e formação de sincício (Zimmer et al., 2001b). Dentro da subunidade F1 foram mapeados 5 sítios

antigênicos conhecidos por I, II, IV, V e VI, sendo o sítio antigênico II da proteína F o que carrega o epítopo de ligação do Palivizumab (Zhao et al., 2004).

1.7 Epidemiologia e Patogenia

Em países em desenvolvimento, as principais causas de morbidade e mortalidade são as infecções respiratórias agudas. Nesses países a severidade, incidência e quantidade de casos fatais também são maiores. Uma das principais causas de infecção respiratória aguda são os vírus respiratórios (Arruda et al., 1991). Dentre os vírus respiratórios, o HRSV é um dos principais patógenos pediátricos e também vem se mostrando de grande importância em pacientes idosos e imunocomprometidos (Bates et al., 2014). Em um recente estudo epidemiológico global, foi estimado que em 2015 houveram aproximadamente 33,1 milhões de casos de infecção respiratória aguda por HRSV. Dentre estes casos, para 3,2 milhões foram necessárias internações hospitalares e 59.600 resultaram em mortes de crianças internadas menores de 5 anos de idade. Neste mesmo período, para crianças menores de 6 meses de idade, foi estimado 1,4 milhões de internações hospitalares, sendo que destas, uma média de 27.300 resultaram na morte das crianças, com grande número ocorrendo próximo ao período neonatal, quando o HRSV se apresenta como apneia ou sepse. Este mesmo estudo ainda relata que devido a fatores como casos não relatados e amostras não testadas estes números podem estar subestimados (Shi et al., 2017).

O HRSV é uma importante causa de internação e morte de crianças em todo o mundo. Seu sintoma clínico e a sua severidade podem variar de acordo com a idade da criança. Normalmente a primeira infecção acontece entre as primeiras 6 semanas de vida e os 2 anos de idade e raramente são assintomáticas. As recidivas durante a vida são comuns, porém tendem a não ser severas (Ogra, 2004).

A população com maior predisposição a desenvolver doença severa resultante da infecção por HRSV são os neonatos, lactentes, crianças nascidas prematuras, com doenças pulmonares crônicas ou cardiopatias congênitas e imunodeficientes (Zhu et al., 2011).

A infecção por HRSV causa doença do trato respiratório inferior em crianças, podendo ocasionar bronquiolite aguda e pneumonia. Os principais sintomas são taquipneia e dispneia, tosse severa e chiado respiratório que podem ser tão fortes a ponto de se assemelharem a ataques de asma, em casos mais severos pode ocorrer

hipóxia, podendo ser observada cianose (Ismail, Reisner, 2001; Lay et al., 2013). Outros sintomas bastante comuns são traqueobronquite ou doença do trato respiratório superior, normalmente acompanhadas por febre e otite média (Ismail, Reisner, 2001).

O HRSV é um vírus sazonal, tendo maior incidência de infecções nas estações frias de climas temperados e em climas tropicais, quando o clima esfria e aumentam as chuvas (Simoës, 1999).

1.8 Profilaxia e Tratamento

O Palivizumab, a única profilaxia aprovada pela FDA (do Inglês - Food and Drug Administration) contra infecção por HRSV (Shadman, Wald, 2011) é um anticorpo IgG monoclonal neutralizante humanizado que se liga no sítio antigênico A, uma região altamente conservada na proteína de fusão F do HRSV, localizada entre os aminoácidos 258 e 275 (Zhu et al., 2011a), impedindo, dessa forma que o vírus entre na célula hospedeira, e conseqüentemente, prevenindo ou reduzindo a severidade da infecção (Murray et al., 2014). De acordo com Collins e Melero, 2011, “Este produto não necessariamente previne a infecção por HRSV, mas consegue restringir a replicação o suficiente para reduzir a doença”.

O Palivizumab é administrado por via intramuscular, na dose de 15 mg/Kg. A aplicação é realizada mensalmente, durante 5 meses, sendo a primeira feita antes do início da temporada de HRSV. Como a imunidade oferecida pelo medicamento é apenas parcial, há a necessidade de reforço mensal, durante todo o período de prevalência do HRSV (Robinson et al., 2013).

Assim como a grande maioria dos vírus de RNA, o HRSV também é altamente mutável, devido à baixa capacidade da RNA-polimerase-RNA-dependente de fazer reparos. Isso faz com que o HRSV seja bastante adaptável às pressões seletivas e proporcionando assim o aparecimento de quasiespécies (Zhao et al., 2004). As quasiespécies naturais de vírus de RNA permitem a emergência rápida de vírus mutantes que escapam da pressão imune do hospedeiro frente a este monoclonal (Moraes et al., 2015). Trabalhos prévios demonstraram que mutações nos aminoácidos S268I, K272Q, K272E, S275L e N276S já existem na população e podem propiciar pacientes com recidivas (Zhu et al., 2011; Papenburg et al., 2012; Tomé et

al., 2012; Oliveira et al., 2015). A subunidade F₁ é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante estas deleções ou substituições de aminoácidos (Collins et al., 2001, Tomé et al., 2012).

No entanto, pouco se sabe sobre a prevalência de tais mutações em amostras clínicas no mundo todo. Além disso, apesar do seu papel em estratégias de patogenia, imunidade e prevenção do HRSV, poucos dados sobre a evolução molecular da proteína F do HRSV estão disponíveis, sobretudo no Brasil, porque os estudos filogenéticos anteriores concentraram-se na glicoproteína G do HRSV.

Portanto, nosso trabalho tem como objetivo, em relação ao HRSV, caracterizar fenotipicamente por microneutralização, amostras de diferentes genótipos circulantes em 2013, que possuem alguma mutação na proteína F, porção parcial F₁ (262 a 276 Aa), particularmente mutações de potencial resistência nos epítomos de ligação do Palivizumab (N268, K272, S275 para os dois tipos de HRSV e N276 para o HRSV-A e S276 para o HRSV-B), de cepas oriundas de crianças que não fizeram uso do Palivizumab.