



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
CURSO DE MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

JESSYLENE DE ALMEIDA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA HEMAGLUTININA E
PB2 DO Vírus *Influenza A* (H1N1) PANDÊMICO ISOLADO NA MESORREGIÃO
METROPOLITANA DE BELÉM.**

Belém - Pará
2012

JESYLENE DE ALMEIDA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA HEMAGLUTININA E
PB2 DO VÍRUS *Influenza A* (H1N1) PANDÊMICO ISOLADO NA MESORREGIÃO
METROPOLITANA DE BELÉM.**

Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora do
Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo
de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará.
Orientador (a): Dr. Marcio Roberto Teixeira Nunes.
Co-orientadora: Dra.Rita Catarina Medeiros Sousa

**Belém - Pará
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Ferreira, Jessylene de Almeida.

Caracterização dos genes codificadores da hemaglutinina e PB2 do vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico isolado na mesorregião metropolitana de Belém / Jessylene de Almeida Ferreira; orientador, Marcio Roberto Teixeira Nunes. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Influenza. I. Nunes, Marcio Roberto Teixeira, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 614.518



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
CURSO DE MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

JESSYLENE DE ALMEIDA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA HEMAGLUTININA E
PB2 DO VÍRUS *Influenza A (H1N1)* PANDÊMICO ISOLADO NA MESORREGIÃO
METROPOLITANA DE BELÉM.**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA.

Aprovado em: 26/10/2012

Banca Examinadora

Dr. Marcio Roberto Teixeira Nunes
Orientador – NMT/UFPA

Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa
Co-Orientadora – NMT/UFPA

Dra. Maísa Silva de Sousa
Avaliadora – NMT/UFPA

Dr. Fernando Neto Tavares
Avaliador – IEC

Dr. Leonardo dos Santos Sena
Avaliador – ICB/UFPA

Dra. Luana da Silva Soares
Suplente – IEC

Aos meus pais, irmãos e namorado a minha eterna gratidão pelo apoio e companheirismo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por ser o meu auxiliador de todas as horas, que nos momentos mais difíceis da minha vida nunca me desamparou.

Considerando esta dissertação de mestrado como resultado de uma longa caminhada, agradecer não seria uma tarefa fácil. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram e contribuíram para minha vida. E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Ao meu pai, Jesuito Ferreira, que também foi um amigo, que não me desamparou e me ensinou a ter paciência e determinação.

Aos meus irmãos, Jessycley Ferreira e Rodrigo Silva, que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim.

Ao meu namorado, amigo e companheiro de todas as horas, Lupercínio Júnior, que sempre esteve ao meu lado sendo muito compreensivo e atencioso. Um anjo da guarda que Deus colocou na minha vida.

A toda minha família, em especial a minha avó Zulmira Ferreira, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa, minha imensa gratidão pela oportunidade a mim dada e pelos conhecimentos repassados. Tenho muita admiração pela senhora ser essa pessoa simples, acessível e sempre aberta para novas discussões.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes, agradeço também a oportunidade, os conhecimentos repassados e a paciência para corrigir os trabalhos.

Ao Dr. Wyller Alencar de Mello, chefe do Laboratório de Vírus Respiratórios, que me deu total liberdade e me concedeu todo o suporte técnico para desempenhar a pesquisa.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Dr^a. Elizabeth Santos.

A seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre Linhares, e aos demais colegas da seção que me apoiaram de forma direta ou indiretamente, em especial a

Luana Soares, que sempre muito paciente respondia as minhas dúvidas e me ajudava como podia sempre.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro.

A Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, que foi o instrumento pelo qual os conhecimentos foram a mim adquiridos.

Ao Edivaldo Júnior, o meu enorme agradecimento por ter me auxiliado em todas as minhas análises.

A todos os amigos do Laboratório de Vírus Respiratórios em especial: a Milla, uma amiga, que me convidou para participar dessa pesquisa e me ajudou sempre respondendo minhas dúvidas; a Luana, mais uma amiga que fiz nessa vida, me deram muito apoio para o término desse trabalho; e ao James que com sua ajuda irrestrita contribuiu imensamente para a finalização desse trabalho, o qual sem o seu auxílio seria muito mais difícil. Sentirei saudades de todos vocês, das nossas conversas e risadas de todas as tardes... O meu enorme obrigada!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo
as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier

RESUMO

A recente pandemia de gripe de 2009/2010 causada pelo vírus A (H1N1) pandêmico mostrou um perfil de gravidade diferente da gripe sazonal, pois um percentual considerável de casos graves e fatais ocorreu em indivíduos adultos jovens, sem comorbidade. A virulência dos vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico resulta de interações protéicas complexas e depende essencialmente de alguns genes virais. O objetivo deste estudo foi caracterizar os genes codificadores da hemaglutinina (H1) e polimerase básica 2 (PB2) do vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico mediante a obtenção de cepas provenientes de pacientes com gripe procedente da mesorregião metropolitana de Belém-PA. O tamanho amostral foi constituído de 87 amostras aleatórias de ambos os sexos de 0 a 96 anos, com síndrome respiratória aguda grave (SRAG) sem nenhuma comorbidade relatada, no período de maio de 2009 a agosto de 2010. As amostras foram isoladas em cultura de célula MDCK e analisadas por técnicas de biologia molecular que compreenderam três etapas principais: a) extração do RNA viral (RNAv) a partir do sobrenadante celular; b) amplificação do RNAv pela técnica de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR); c) sequenciamento completo dos genes codificadores da H1 e PB2. Das 87 cepas amplificadas pelo RT-PCR, em 82 tornou-se possível a obtenção e análise de sequências para o gene HA, enquanto que de 81 amostras virais obteve-se sequências para o gene PB2. A análise comparativa das sequências obtidas com a sequência da cepa vacinal (A/California/07/2009(H1N1)) revelou substituições aminoacídicas na HA (P83S; D97N; S203T; D222G; Q293H e I321V) e na PB2 (K340N; K526R e M631L), no entanto sem associação a hospitalização. Ao nível de substituição na HA, a D97N isolada ou associada com a S203T, foi detectada com mais frequência na primeira onda. Já ao nível da PB2 a substituição K526R foi mais encontrada em cepas que circularam na primeira onda, enquanto que, a M631L foi mais evidenciada na segunda. A substituição D222G na HA só foi encontrada em casos de óbitos. Por fim, observou-se uma tendência de alterações nos sítios antigênicos da HA. Sendo assim, a contínua vigilância genética e antigênica do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm em circulação, bem como o compartilhamento de informações é de extrema importância para a melhor recomendação possível para os vírus que entram na composição vacinal evitando assim maior risco de epidemias severas no futuro.

ABSTRACT

The recent influenza pandemic of 2009/2010 caused by the *Influenzavirus A* (H1N1) pandemic showed a severity profile different from seasonal flu due to a significant percentage of severe and fatal cases occurred in young adults without comorbidity. The virulence of *Influenzavirus A* (H1N1) pandemic is the result of protein interaction complexes and is related essentially some viral genes. The aim of this study was to characterize the genes that encodes for the hemagglutinin (H1) and polymerase basic 2 (PB2) of *Influenzavirus A* (H1N1) pandemic recovered from patients with flu coming from the metropolitan mesoregion, Belém-PA. The sample size consisted of 87 random samples of both genders, the 0-96 years, with severe acute respiratory syndrome (SARS) without comorbidity reported from May 2009 to August 2010. The samples were isolated in MDCK cell, and analyzed by molecular biology techniques that comprised three main steps: a) viral RNA (vRNA) extraction from supernatant of infected cells; b) amplification of the vRNA by Polymerase Chain Reaction preceded by Reverse Transcription (RT-PCR) technique; c) complete sequencing of genes encoding H1 and PB2. Of 87 strains amplified by RT-PCR in 82 amplicons the acquisition and analysis of sequences for the HA gene was obtained, whereas in 81 amplicons viral sequences were obtained for the PB2 gene. The comparative analysis of the sequences obtained with the sequence of the vaccine strain (A/California/07/2009 (H1N1)) revealed amino acid substitutions in HA (P83S, D97N; S203T, D222G, and I321V Q293H) and PB2 (K340N, and K526R M631L) proteins any changes were, however not associated with hospitalization. At the level of substitution in HA, the D97N alone or associated with the S203T was detected more frequently in the first wave. Furthermore, the level of PB2, a substitution K526R was found in the majority of strains that circulated during the first wave, while the M631L was more evident in the second. The D222G substitution in HA was only found in cases of death. Finally, there was a tendency of changes in HA antigenic sites. Thus, the genetic and antigenic continuous surveillance of *Influenzavirus A* (H1N1) pdm in circulation, as well as the sharing of information is extremely important for the best possible recommendation for virus which are included in vaccine the composition thus avoiding higher risk of severe epidemics in the future.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Páginas
Figura 1	Ocorrência do vírus da gripe em relação as pandemias.	25
Figura 2	Distribuição do vírus pandêmico na região norte e parte da nordeste por mês nos anos 2009 e 2010.	28
Figura 3	Micrografia eletrônica do vírus <i>Influenza A</i> pandêmico cultivado em cultura de células de rim canino (MDCK).	30
Figura 4	Representação esquemática da partícula viral do vírus <i>Influenza</i> demonstrando o aspecto morfológico, e as suas respectivas proteína.	31
Figura 5	Esquema representativo do genoma do vírus <i>Influenza A</i> .	32
Figura 6	Representação simplificada da replicação do vírus <i>Influenza</i> .	35
Figura 7	Ilustração esquemática do <i>Drift</i> e <i>Shift</i> antigênico.	37
Figura 8	Imagem de um monômero de hemaglutinina da pandemia de 1918 (H1N1).	38
Figura 9	Ilustração da ligação entre o vírus <i>Influenza</i> e o ácido siálico $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$.	40
Figura 10	Gênese do vírus <i>Influenza A</i> (H1N1) pandêmico, 2009.	42
Figura 11	Estrutura cristalográfica da proteína PB2 com os resíduos E627, S590 e R591 do vírus (H1N1) pandêmico.	48
Figura 12	Ilustração esquemática para demonstrar como se alcançou a população de estudo.	53
Figura 13	Estrutura cristalográfica da proteína H1 do vírus H1N1 pdm. A: Resíduo 203. B: Resíduo 222. Ambos identificados por setas pretas.	69
Figura 14	Estrutura cristalográfica da proteína HA com os resíduos Q293 e H293 do vírus (H1N1) pandêmico, os mesmos são identificados com setas pretas.	69
Figura 15	Estrutura tridimensional da molécula da HA demonstrando as suas principais modificações.	70
Figura 16	Substituições aminoacídicas na HA de acordo com as ondas.	70
Figura 17	Estrutura cristalográfica da proteína PB2 ilustrando na ampliação a alteração conformacional do resíduo K340 para N340 do vírus (H1N1) pandêmico.	74

Figura 18	Estrutura cristalográfica da proteína PB2 ilustrando os resíduos M631 e L631 do vírus (H1N1) pandêmico.	74
Figura 19	Substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com as ondas.	75
Figura 20	Distribuição dos orbitais em relação à substituição.	78

LISTA DE TABELAS E QUADROS

		Páginas
Tabela 1	Taxa de mortalidade por <i>Influenza</i> pandêmica (H1N1) 2009, por região geográfica. Brasil, SE 16 a 52 de 2009.	28
Tabela 2	Discriminação das amostras quanto ao sexo, idade, período e hospitalização para a proteína HA e PB2 do vírus <i>Influenza A</i> (H1N1) pdm.	66
Tabela 3	Substituições aminoacídicas na proteína HA do vírus <i>Influenza A</i> (H1N1) pdm circulante na mesorregião de Belém durante a pandemia de 2009/2010.	67
Tabela 4	Distribuição das substituições aminoacídicas na HA de acordo com as ondas	71
Tabela 5	Distribuição das substituições aminoacídicas na HA de acordo com a hospitalização.	71
Tabela 6	Substituições aminoacídicas na HA de acordo com a idade e sexo.	72
Tabela 7	Substituições aminoacídicas na sequência da PB2 do H1N1pdm.	72
Tabela 8	Distribuição das substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com a onda.	76
Tabela 9	Distribuição das substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com a hospitalização.	76
Tabela 10	Substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com a idade e sexo.	76
Quadro 1	Proteínas codificadas pelos segmentos de RNA do vírus <i>Influenza A</i> .	33
Quadro 2	Substituições aminoacídicas encontradas na HA do vírus <i>Influenza A</i> pandêmico relacionado ao possível resultado.	46
Quadro 3	Sequência de iniciadores e sondas utilizadas na RT-PCR em tempo real.	55
Quadro 4	Descrição do volume de cada reagente que deve constituir a <i>mix</i> por reação.	56
Quadro 5	Interpretação dos resultados por RT-PCR em tempo real.	57
Quadro 6	Sequências de iniciadores utilizados na RT-PCR para o gene da hemaglutinina.	59
Quadro 7	Sequências de iniciadores utilizados na RT-PCR para o gene PB2.	60
Quadro 8	Sequência de iniciadores utilizados na reação de sequenciamento para os genes HA e PB2.	61
Quadro 9	Descriminação das amostras analisadas.	66
Quadro 10	Mudanças nos aminoácidos da HA no vírus H1N1pdm da Mesorregião Metropolitana de Belém, comparadas aos resíduos das cepas de referência 2012 e cepa vacinal.	68
Quadro 11	Mudanças nos aminoácidos da PB2 no vírus H1N1pdm na Mesorregião Metropolitana de Belém, comparadas aos resíduos das cepas de referência 2012 e cepa vacinal.	73
Quadro 12	Identificação e caracterização do perfil de cada óbito.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Generalidades

ANF	Aspirado nasofaríngeo
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
CNR	Centro Nacional de Referência
cRNA	Ácido ribonucléico complementar
D97N	Substituição no aminoácido 97 de uma ácido aspártico por uma asparagina
D222E	Substituição no aminoácido 222 de um ácido aspártico por um ácido glutâmico
D222G	Substituição no aminoácido 222 de um ácido aspártico por uma glicina
D222N	Substituição no aminoácido 222 de um ácido aspártico por uma asparagina
D239G	Substituição no aminoácido 239 de um ácido aspártico por uma glicina
E627K	Substituição no aminoácido 627 de um ácido glutâmico por uma lisina
E627	Uma lisina na posição 627
ED	Domínio efetor da proteína NS1
InfA	Detector do vírus <i>Influenza A</i>
IFN	Interferon
IFN- β	Interferon - beta
I312V	Substituição no aminoácido 312 de uma isoleucina por uma valina
I123V	Substituição no aminoácido 123 de uma isoleucina por uma valina
IEC	Instituto Evandro Chagas
I321V	Substituição no aminoácido 321 de uma isoleucina por uma valina
K340N	Substituição no aminoácido 340 de uma lisina por uma asparagina
K526R	Substituição no aminoácido 526 de uma lisina por uma asparagina
LACEN	Laboratório Central
MDCK	Cultura de células de rim canino (<i>Madin Darbin Canine Kidney</i>)
Mrna	Ácido ribonucléico mensageiro
M631L	Substituição no aminoácido 631 de uma metionina por uma leucina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
pdm	Pandêmico
Pré-mRNA	Pré-Ácido ribonucléico mensageiro
P83S	Substituição no aminoácido 83 de uma prolina por uma serina
P314S	Substituição no aminoácido 314 de uma prolina por uma serina
Q293H	Substituição no aminoácido 293 de uma glutamina por uma histidina
Q310H	Substituição no aminoácido 312 de uma Glutamina por uma Histidina
RBD	Domínio de ligação do receptor (<i>Receptor Binding Domain</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
RP	RNase P humana
RT- PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcriptase reversa
R59I	Arginina no aminoácido 312
SA α 2,3Gal	Ácido siálico ligado a galactose por uma ponte α 2,3
SA α 2,6Gal	Ácido siálico ligado a galactose por uma ponte α 2,6
SC	Swab combinado
SE	Semana epidemiológica
SN	Secreção nasofaríngea
SNC	Sistema Nervoso Central

SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
swFluA	Detector para o vírus <i>Influenza A Suíno Universal</i>
swH1	Detector para o vírus <i>Influenza A Suíno H1</i>
S203T	Substituição no aminoácido 203 de uma serina por uma treonina
S206T	Substituição no aminoácido 206 de uma serina por uma treonina
S590	Serina no aminoácido 590
vRNA	Ácido ribonucléico viral

2. Proteínas Virais

H, HA	Hemaglutinina
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
N, NA	Neuraminidase
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2 / NEP	Proteína não estrutural 2
PA	Polimerase ácida
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PB1-F2	Polimerase básica 1- frame 2
RNP	Ribonucleoproteína

3. Aminoácidos

Nome	Abreviaturas	
	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico (Aspartato)	Asp	D
Ácido glutâmico (Glutamato)	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. GERAL	21
3.2. ESPECÍFICOS	21
4. REFERENCIAL TEÓRICO	22
4.1. HISTÓRICO	22
4.1.1. A “primeira” pandemia de gripe	22
4.1.2. Pandemia de 1918: “Gripe Espanhola” (H1N1)	23
4.1.3. Pandemia de 1957: “Gripe Asiática” (H2N2)	24
4.1.4. Pandemia de 1968: “Gripe de Hong Kong” (H3N2)	25
4.1.5. A Re-emergência do vírus H1N1 em 1977: Gripe “Russa” (H1N1)	26
4.1.6. Pandemia de 2009: “Gripe Suína” (H1N1)	26
4.2. O VÍRUS Influenza	29
4.2.1. Classificação e Nomenclatura	29
4.2.2. Estrutura viral e organização do genoma viral	29
4.2.3. Replicação viral	34
4.2.4. O vírus <i>Influenza A</i> em suínos	35
4.2.5. Variabilidade Antigênica	36
4.2.6. Determinantes moleculares de patogenicidade	39
4.3. VÍRUS Influenza A (H1N1) PANDÊMICO	41

4.3.1.	Origem genética	41
4.3.2.	Aspectos Clínicos da Gripe	43
4.3.3.	Substituições aminoacídicas associada à gravidade	44
4.3.4.	Transmissão	49
4.3.5.	Diagnóstico	49
4.3.6.	Tratamento.....	50
5.	MATERIAL E MÉTODOS	52
5.2.	POPULAÇÃO DE ESTUDO	52
5.3.	TAMANHO AMOSTRAL	52
5.5.	COLETA DAS AMOSTRAS.....	54
5.6.	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	54
5.7.	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL (vRNA)	55
5.8.	DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL.....	55
5.9.	ISOLAMENTO VIRAL	57
5.11.	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	58
5.11.1.	Extração do RNA viral – vRNA	59
5.11.2.	Amplificação dos genes codificadores da HA e PB2.....	59
5.11.3.	Purificação e quantificação do produto RT-PCR.....	60
5.11.4.	Sequenciamento dos genes codificadores da HA e PB2.	61
5.12.	MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS	62
5.12.1.	Procura e seleção de modelos estruturais (<i>templates</i>).....	63
5.12.2.	Alinhamento do modelo estrutural (<i>templates</i>)/alvo.....	63

5.12.3. Construção do modelo.....	64
5.12.4. Avaliação dos modelos	64
5.13. AVALIAÇÃO ÉTICA DA PESQUISA	65
6. RESULTADOS	66
6.1. HEMAGLUTININA (HA)	67
6.2. POLIMERASE BÁSICA 2 (PB2)	72
6.3. ÓBITOS	77
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÃO.....	85
9. REFERÊNCIAS	86
10. ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

A gripe é uma infecção respiratória aguda (IRA) de origem viral, altamente contagiosa, considerada como o paradigma das doenças virais, devido sua evolução genética contínua. Historicamente, o vírus da gripe ou vírus *Influenza*, é um dos principais responsáveis por mortes em todo o mundo. No século passado, ocorreram três pandemias de gripe: a Espanhola em 1918, a Asiática em 1957, e, em 1968, a de Hong Kong (NEUMANN E KAWAOKA, 2009). Os agentes responsáveis pela gripe são os vírus *Influenza* A, B e C, pertencentes à família *Orthomyxoviridae*.

O vírus *Influenza* A é responsável por pandemias e epidemias anuais, causando, muitas vezes, quadros graves de infecção respiratória, atingindo todas as faixas etárias. Esses vírus infectam não somente o homem, mas também várias espécies de mamíferos (suínos, equinos, cetáceos), além de aves domésticas (galinha, ganso, peru) e selvagens, estas últimas constituem o reservatório natural. Os subtipos de vírus *Influenza* de tipo A referem-se à antigenicidade de suas proteínas de superfície, HA (H1 a H17) e NA (N1 a N9), a exemplo H1N1, H2N2, H3N2 e H5N1 (PALESE E SHAW, 2007).

O vírus *Influenza* B pode causar ocasionalmente epidemias, mas não está associado a pandemias e além do homem, tem sido isolado de focas. O vírus tipo C é endêmico e esporadicamente causa infecções respiratórias brandas ou assintomáticas, já foram isolados de suínos e caninos (PALESE E SHAW, 2007; TAUBENBERG E MORENS, 2008; VÉLEZ, 2002).

O genoma do vírus *Influenza* é constituído de 8 segmentos (vírus A e B) de RNA de fita simples e de polaridade negativa (RNA_v), enquanto que o vírus *Influenza* C possui apenas sete segmentos. Devido essa natureza segmentada do genoma, o processo de rearranjo genético no vírus *Influenza* é favorecido. O rearranjo pode ocorrer nos três tipos de vírus *Influenza*, mas não foi observado entre os três tipos. Tende a ocorrer durante infecções por mais de um subtipo ou linhagem viral, no momento da redistribuição dos segmentos que se fazem aleatoriamente nos vírions neoformados (KEDWAI et al, 2011; WEBSTER, 2002).

Durante os anos de 2009 e de 2010 o mundo vivenciou a primeira pandemia de gripe do século XXI, sendo esta ocasionada por um vírus *Influenza* A (H1N1) de origem

suína. Este vírus foi inicialmente detectado em abril de 2009 nos Estados Unidos da América (denominado como A/California/04/2009) e a seguir, no México e Canadá. Análises genéticas preliminares revelaram que o novo H1N1 de origem suína é resultado de um rearranjo genético complexo, com genes provenientes de um vírus H1N1 de origem aviária (segmentos PB2 e PA), outro de origem humana (PB1) de um vírus A (H3N2); os demais genes foram doados por vírus H1N1 de origem suína do continente norte americano (H1, NP, NS) e da Europa (N1, M) (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009).

No mundo todo, mais de 418.000 casos de gripe pelo novo vírus foram confirmados laboratorialmente durante o período da pandemia. Como na maioria dos países apenas os casos graves e confirmados laboratorialmente, foram notificados, esse número deve representar cerca de 1/10 a 1/20 do número total de casos de gripe no planeta. Até 2010 já ocorreram mais de 16.000 óbitos relacionados à infecção pelo vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico (OMS, 2010). No Brasil de acordo com os dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2010) durante a fase de contenção, dos 4.434 casos confirmados por critério laboratorial ou clínico epidemiológico, 35% (1.556) apresentaram quadro clínico de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), definida por febre, tosse e dispnéia. A taxa de incidência nacional de SRAG por *Influenza* pandêmica (H1N1) em 2009 foi de 23,3/100.000 habitantes, sendo que os grupos etários de menores de 2 anos, e de 20 a 29 anos foram os mais acometidos pela forma mais severa da gripe (SHEN et al., 2009).

O desenvolvimento de formas severas de gripe tem causa multifatorial, que envolve não somente aspectos inerentes ao sistema imunológico do hospedeiro como também vários determinantes de virulência das cepas de vírus *Influenza*, muitos dos quais já bem descritos. Os genes codificadores das proteínas virais hemaglutinina (HA) e polimerase básica 2 (PB2) têm sido os mais implicados na maior ou menor virulência dos diversos subtipos de vírus *Influenza A*. Alguns dos resíduos aminoacídicos dessas proteínas foram encontrados em cepas de vírus A (H1N1) pandêmico isolado em algumas regiões do planeta. A evolução genética do vírus A (H1N1) pode resultar em acúmulo de mutações que tenham impacto na virulência das cepas que circularão nos próximos anos.

2. JUSTIFICATIVA

O vírus *Influenza* causa epidemias anuais e pandemias ocasionais que custam a vida de milhões de pessoas. O surgimento de novas cepas continuará desafiando a saúde pública e a comunidade científica. A recente pandemia da gripe causada pelo vírus da gripe de origem suína H1N1 permitiu verificar fatores de virulência, a propagação da infecção, além de preparar para surtos de gripe importantes no futuro. Há preocupações de que esse vírus possa sofrer mutações ou rearranjos genéticos com outros vírus *Influenza* existentes, dando origem a vírus com maior potencial de transmissão e patogenicidade. Assim, a preparação, à escala global, contra uma potencial cepa de maior virulência é altamente recomendável.

A ausência de estudos sobre os aspectos moleculares virais determinantes na virulência e quadro clínico apresentado em indivíduos acometidos por gripe grave ocasionada pelo vírus A (H1N1) pandêmico na região Amazônica é evidente.

Sendo assim, a análise desses aspectos é de fundamental importância para a região. Além desses aspectos, o monitoramento cuidadoso da gripe durante o período mais chuvoso em Belém também é de importância crítica, uma vez que é possível detectar o surgimento de variantes mais virulentas.

Neste contexto, através desse estudo pretende-se fazer o monitoramento e detecção de possíveis mutações que podem estar associadas à maior virulência, investigando os determinantes moleculares nos genes codificadores das proteínas virais hemaglutinina e PB2, que corroboraram para a patogenicidade do vírus durante a pandemia de 2009/2010 na cidade de Belém.

3. OBJETIVOS

3.1.GERAL

Caracterizar os genes codificadores da hemaglutinina e PB2 do vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico provenientes de pacientes com gripe procedente da mesorregião metropolitana de Belém-PA.

3.2.ESPECÍFICOS

- Identificar a frequência das substituições aminoacídicas nas proteínas codificadas pelos genes H1 e PB2 que possam estar relacionadas com maior virulência;
- Determinar a diferença das substituições aminoacídicas nas proteínas codificadas pelos genes H1 e PB2 nas duas fases da pandemia;
- Verificar a possível associação das substituições aminoacídicas nas proteínas codificadas pelos genes H1 e PB2 com sexo, idade e hospitalização;
- Demonstrar a ocorrência de mudança conformacional da proteína para cada substituição aminoacídica.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. HISTÓRICO

Os relatos históricos sobre a gripe estão relacionados aos advenços das epidemias e pandemias, pois foram com esses eventos que as descrições e investigações sobre a doença foram ampliadas. O primeiro relato que se assemelha a gripe foi descrito por Hipócrates em 412 a.C., quando uma infecção respiratória ocorreu de forma epidêmica na Grécia e em poucas semanas matou centenas de pessoas. Há relatos históricos de infecções compatíveis com aquelas causadas pelo vírus da gripe durante a guerra do Peloponeso, que atingiu duramente Atenas em 430 a.C., e também durante a Guerra dos Cem Dias (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; POTTER, 2001).

No decorrer dos séculos ocorreram outras epidemias e/ou pandemias possivelmente ocasionadas pelo vírus *Influenza*. Contudo, a afirmação dos dados históricos primários sobre a gripe é difícil, uma vez que os sintomas são relativamente semelhantes aos de outras doenças (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; MARTIN E MARTIN-GRANEL, 2006; POTTER, 2001).

O termo *Influenza* data da Idade Média, século XV, quando na região de Florença (Itália), julgava-se que os sinais clínicos de febre, tosse e calafrios ocorriam por “influência” das estrelas (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; VELÉZ, 2002).

4.1.1. A “primeira” pandemia de gripe

As pandemias de gripe foram mais bem documentadas a partir do século XVI, quando, em 1580, foi descrita uma pandemia que teve início na Ásia se espalhou para África e, em seguida foi para a Europa onde, em um período de seis meses, grande parte da população da Europa foi atingida (POTTER, 2001).

No decorrer dos séculos, as pandemias continuaram acontecendo e ocasionando muitas mortes. Durante o período de 1830 à 1833 ocorreu uma pandemia considerada – em termos de gravidade – similar à pandemia de 1918, apresentando uma alta taxa de ataque de

20 a 25% da população, porém com mortalidade não elevada (PATTERSON, 1984; PYLE 1986).

4.1.2. Pandemia de 1918: “Gripe Espanhola” (H1N1)

A pandemia de 1918, ou Gripe Espanhola, destacou-se como o evento único e marcante na história, levando a óbito mais pessoas do que a Primeira Guerra Mundial. Tal pandemia foi responsável por aproximadamente 50 milhões de mortes em todo o mundo, reduzindo a expectativa de vida nos Estados Unidos da América em 10 anos. Segundo Wright e colaboradores (2007) a AIDS matou 25 milhões de pessoas nos primeiros 25 anos – A Gripe Espanhola matou o equivalente em 25 semanas (setembro de 1918 a março de 1919). E de acordo com Taubenberger e colaboradores (2001) estima-se que 28% da população mundial – 500 milhões de pessoas – foram contaminados durante a pandemia.

Apesar da denominação “Espanhola”, o lugar de origem da pandemia de 1918/1919 é controverso e ainda desconhecido (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; TAUBENBERGER E MORENS, 2010). A Espanha, um país neutro durante a 1ª guerra mundial, não censurava nas notícias e o surto foi extensivamente divulgado pelos meios de comunicação sendo rapidamente chamada de “Gripe Espanhola”. Essa pandemia ocorreu em três ondas: a primeira, com poucos casos severos, iniciou na primavera de 1918 e foi logo substituída em setembro, outubro e novembro de 1918 por uma segunda onda, a qual resultou em taxas de mortalidade de mais de 2,5%, comparado a menos de 0,1% tipicamente registrado em epidemias de gripe. No entanto, a terceira onda, com taxa de mortalidade igual a segunda, foi a que varreu o mundo em 1919. O padrão de morbimortalidade, entretanto, diferiu das demais epidemias, pois se observou elevada taxa de óbitos em adultos jovens e idosos. De fato, a taxa de mortalidade no grupo de idade entre 15 à 35 anos foi 20 vezes maior do que o previsto para a faixa etária e o grupo com 65 ou mais anos de idade representava 99% do excedente de morte (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; WRIGHT et al, 2007).

No que concerne aos sintomas, caracteristicamente o início ocorria de modo súbito, com febre alta, tosse, faringite, rinorréia, mialgia e cefaléia severa. Patologicamente, a doença era restrita ao trato respiratório, e as mortes foram devido a pneumonia e insuficiência respiratória com ausência de infecção sistêmica. Muitos pacientes morreram devido a pneumonia bacteriana secundária, todavia alguns demonstraram uma expressiva hemorragia

pulmonar aguda ou edema pulmonar, sugerindo a extrema virulência deste patógeno (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; TAUBENBERGER et al, 2001; WRIGHT et al, 2007).

Apesar do vírus não ter sido isolado durante a pandemia, fragmentos de RNA (ácido ribonucléico) viral foram recuperados a partir do tecido pulmonar preservado das vítimas. Desse modo, as sequências genômicas do vírus foram determinadas, revelando um vírus similar ao H1N1 aviário que contém uma assinatura de aminoácidos do tipo viral associado a humanos em várias proteínas, ademais a ausência de um sítio de clivagem multibásico na hemaglutinina, uma marca de patogenicidade do vírus da gripe aviária, indica que a perda deste sítio não foi responsável pela maior virulência da cepa do H1N1 circulante (REID et al, 1999; TAUBENBERGER et al, 2001; POTTER, 2001; WRIGHT et al, 2007).

4.1.3. Pandemia de 1957: “Gripe Asiática” (H2N2)

O vírus pandêmico que surgiu em 1957-1958 é um descendente direto do vírus pandêmico H1N1 de 1918 que, de alguma forma, adquiriu três novos segmentos de genes de vírus aviário (TAUBENBERGER E MORENS, 2010). Os genes que codificam as duas proteínas da superfície viral, que eram H1 e N1, foram substituídos respectivamente pelos subtipos H2 e N2 de origem aviário, através do mecanismo de rearranjo genético entre vírus humanos/aviário (figura 1). Além desses, o gene que codifica a polimerase PB1 também foi substituído por um gene de origem aviário (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; TAUBENBERGER E MORENS, 2010).

A emergência do vírus da gripe asiática H2N2 foi detectada pela primeira vez em abril de 1957, sendo isolado em maio no Japão. Em outubro do mesmo ano foi assinalada a primeira onda da pandemia atingindo os Estados Unidos e o Reino Unido, seguida de uma segunda em janeiro de 1958. A taxa de mortalidade e dispersão não foi tão impressionante quanto da pandemia anterior, de 1918, no entanto observou-se uma considerada mortalidade. Só nos Estados Unidos foram notificadas 70 mil mortes e mais de um milhão em todo o mundo. A taxa de infecção foi elevada na faixa etária de 5 a 19 anos (POTTER, 2001; TAUBENBERGER E MORENS, 2010; WRIGHT et al, 2007).

A patologia e aparência clínica foram similares ou idênticas as causadas pelo vírus de 1918 e após cerca de dois anos o vírus tornou-se sazonalmente endêmico e esporádico,

desaparecendo completamente no período de onze anos (TAUBENBERGER E MORENS, 2010).

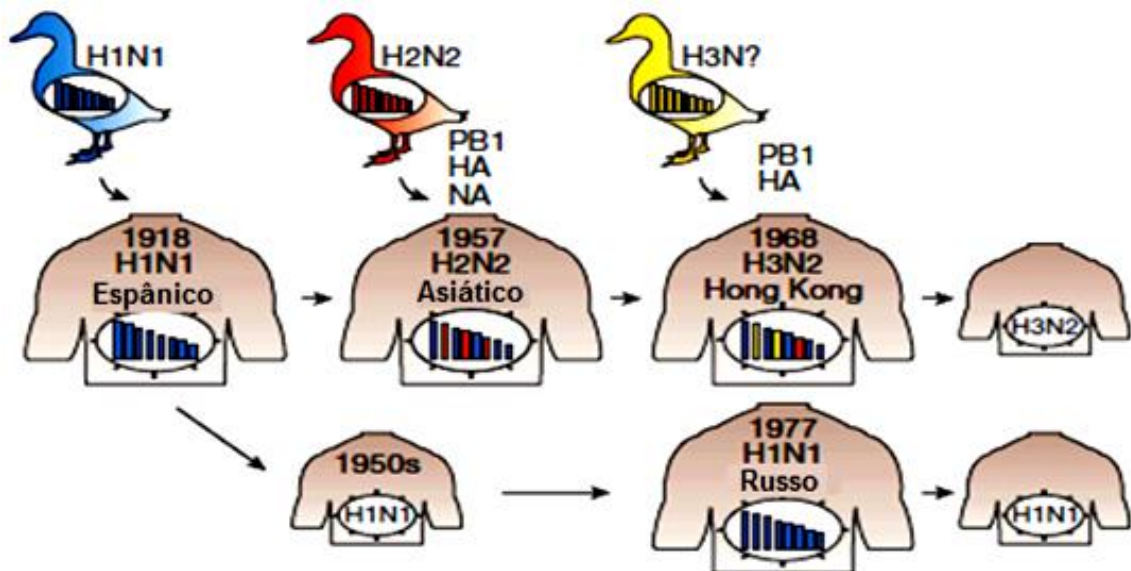


FIGURA 1. Ocorrência do vírus da gripe em relação às pandemias.
Fonte: Neumann e Kawaoka, 2009.

4.1.4. Pandemia de 1968: “Gripe de Hong Kong” (H3N2)

Após 11 anos, o vírus *Influenza A* (H2N2) foi substituído por outro que também apresentava rearranjo humano/aviário que continha o gene H3 e PB1 de origem viral aviária. Os outros seis segmentos gênicos, incluindo o gene NA, foram mantidos do vírus H2N2 de 1957 (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; TAUBENBERGER E MORENS, 2010; WRIGHT et al, 2007).

O H3N2 foi isolado pela primeira vez em Hong Kong, em julho de 1968, causando a pandemia nos invernos de 1968-1969 e 1969-1970. Nos Estados Unidos estimou-se que 33.800 pessoas morreram de gripe. Tal como em 1957, o vírus tornou-se rapidamente endêmico e causador de gripe sazonal, mantendo-se sua circulação até hoje (TAUBENBERGER E MORENS, 2010).

4.1.5. A Re-emergência do vírus H1N1 em 1977: Gripe “Russa” (H1N1)

Em maio de 1977, uma epidemia de gripe foi relatada na China, afetando quase exclusivamente adultos jovens, indicando que indivíduos mais velhos eram protegidos por uma imunidade pré-existente. Mais uma vez, um vírus de gripe do subtipo H1N1 (A/USS/77) foi detectado; este se assemelhava muito com o vírus que havia circulado no início da década de 1950 (figura 1), sugerindo uma liberação acidental a partir de laboratórios de microbiologia. O reaparecimento do vírus H1N1 não substituiu os vírus H3N2 circulantes até o momento, e ambos cocirculam em humanos atualmente (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; WRIGHT et al, 2007).

4.1.6. Pandemia de 2009: “Gripe Suína” (H1N1)

Em meados de fevereiro de 2009, um surto de doença respiratória se iniciou na cidade de La Gloria, Veracruz no México. No princípio de abril, autoridades de saúde pública no México iniciaram investigações sobre o número elevado de doenças pulmonares e gripais, e informaram a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), o escritório regional da Organização Mundial de Saúde (OMS), de uma possível epidemia. Nos Estados Unidos, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) identificou e confirmou dois casos, independentemente coletados no sul da Califórnia, de doença respiratória causada pelo novo vírus *Influenza A* (H1N1) e o caracterizaram como sendo de origem suína (NEUMANN E KAWAOKA, 2009).

Em 21 de abril, o CDC/EUA notificou o achado à OMS segundo a aplicação do Regulamento Sanitário Internacional de 2005 (RSI 2005). Em 23 de abril, a Agência de Saúde Pública do Canadá também detectou o vírus *Influenza A* (H1N1) de origem suína em espécimes recebidos do México. A partir de então, novos casos confirmados em cidades do México e Califórnia desencadearam alerta para o mundo pelo CDC e OMS em 24 de abril (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009; SULLIVAN et al, 2010).

Em 25 de abril de 2009, a OMS declarou a Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII). Em 27 de abril, a propagação internacional e os focos de transmissão de humano para humano levaram a OMS a mudar o alerta de pandemia de fase 3

para fase 4, e logo em seguida, em 29 de abril, foi alterado novamente o alerta pandêmico de 4 para nível 5, indicando a disseminação do vírus em pelo menos dois países de uma mesma região administrativa da OMS, naquela ocasião, o continente americano (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009; SULLIVAN et al, 2010).)

Em 11 de junho de 2009, a OMS declarou a última mudança para a fase 6, significando que já havia a disseminação da infecção entre humanos, em nível comunitário, em diferentes regiões (continentes) do mundo (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009; SULLIVAN et al, 2010).

No cenário brasileiro, em 7 de maio de 2009, divulgaram-se os primeiros resultados laboratoriais realizados pelos Laboratórios da Fiocruz/RJ e Instituto Adolfo Lutz/SP, ambos de referência nacional para o processamento de amostras de vírus *Influenza*. Eram quatro adultos jovens, dois de São Paulo, um do Rio de Janeiro e outro de Minas Gerais e todos com histórico de viagem recente ao México ou aos EUA. Todavia o número de vítimas não se manteve nesse ponto, e logo a infecção atingiu uma variedade de pessoas no país. Dessa forma, a pandemia foi dividida em duas fases epidemiológicas e operacionais distintas no Brasil, são elas: fase de contenção e fase de mitigação (BRASIL, 2010).

A fase de contenção (1): Período em que o vírus estava disseminando-se no mundo e os casos estavam relacionados às viagens internacionais ou contato com pessoas doentes que tinham realizado viagens internacionais. Nessa fase, as ações de vigilância e resposta buscaram frear a disseminação do vírus no país, visando a proteção da população e a instrumentalização do Sistema Único de Saúde (SUS), além de permitir o acúmulo de maior conhecimento para o enfrentamento do evento. As medidas de internação com isolamento de casos de síndrome gripal, tratamento com antivirais, busca ativa e quarentena de contatos tinham como objetivo reduzir o risco de transmissão comunitária. Epidemiologicamente, esta fase compreendeu da semana epidemiológica (SE) 16, período de identificação dos primeiros casos suspeitos, a SE 28, período da declaração de transmissão sustentada (BRASIL, 2010).

A fase de mitigação (2): Compreendeu o período a partir da SE 29, após a declaração de transmissão sustentada do vírus pandêmico, em todo o território nacional. As ações recomendadas para esta fase visam reduzir a gravidade e mortalidade pela doença, por meio do diagnóstico e tratamento dos casos que apresentam risco para doença grave ou óbito, ou que apresentam algum sinal de agravamento (BRASIL, 2010).

De acordo com os dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2010) durante a fase de contenção, dos 4.434 casos confirmados por critério laboratorial ou clínico epidemiológico, 35% (1.556) apresentaram quadro clínico de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), definida por febre, tosse e dispnéia. E, durante a fase de mitigação a taxa de incidência nacional de SRAG confirmada por *Influenza* pandêmica (H1N1) 2009 foi de 23,3/100.000 habitantes, sendo que a maior incidência foi observada no grupo etário de menores de 2 anos, seguido do grupo de 20 a 29 anos. Ressalta-se ainda que a menor incidência ocorreu na faixa etária acima de 60 anos. O Brasil registrou 2.051 óbitos por *Influenza* pandêmica em 2009, apresentando uma taxa de mortalidade de 1,1/100 mil habitantes. A Tabela 1 demonstra que a região Sul apresentou a maior taxa de mortalidade (3/100 mil habitantes), seguida da região Sudeste (1,2/100 mil habitantes). A letalidade dentre os casos de SRAG por *Influenza* pandêmica (H1N1) 2009 no país foi de 4,6% (2.051/44.544).

Tabela 1. Taxa de mortalidade por *Influenza* pandêmica (H1N1) 2009, por região geográfica. Brasil, SE 16 a 52 de 2009.

Região	Casos confirmados H1N1 pdm	Óbitos	População 2009	Taxa de mortalidade (100 mil habitantes)
Sul	30.629	840	27.718.097	3,0
Sudeste	11.738	973	80.915.637	1,2
Centro-Oeste	621	138	13.895.467	1,0
Norte	844	43	15.359.645	0,3
Nordeste	712	57	53.591.299	0,1
Brasil	44.544	2.051	191.481.045	1,1

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, 2010.

No Pará, a circulação do vírus pandêmico se caracterizou em dois períodos ou ondas, que ocorreram nos meses de agosto, setembro e outubro de 2009 e fevereiro, março e abril de 2010 (figura 2).

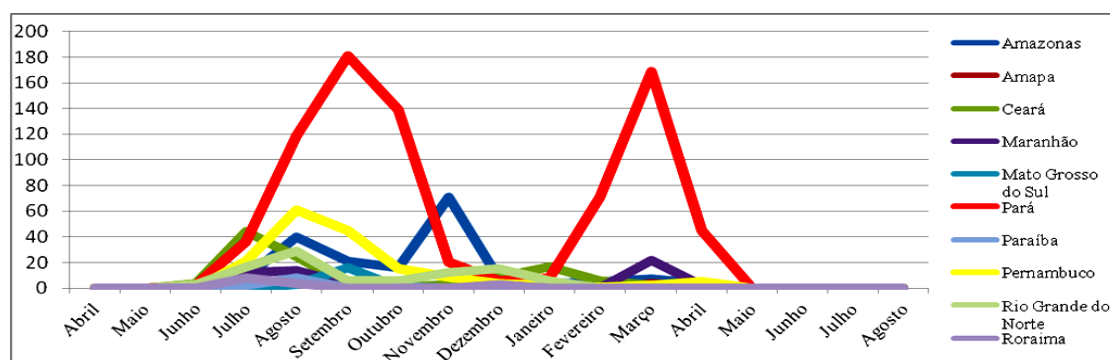


FIGURA 2. Distribuição do vírus pandêmico na região norte e parte da nordeste por mês nos anos 2009 e 2010.

Fonte: SVS, IEC.

4.2. O VÍRUS *Influenza*

4.2.1. Classificação e Nomenclatura

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2012), os vírus *Influenza* pertencem à família *Orthomyxoviridae* (*orthos* – original, verdadeiro; *myxa* - *muco*) que é constituída por cinco gêneros: vírus *Influenza A*; vírus *Influenza B*; vírus *Influenza C*; *Thogotovirus*, que contém duas espécies virais, o vírus *Thogoto* e o vírus *Dhori*; e *Isavirus* que contém a espécie viral da anemia infecciosa do salmão (*Infectious salmon anemia virus* - ISA). Entre os cinco gêneros acima citados, somente os vírus *Influenza A*, B e C estão envolvidos em quadros de infecções respiratórias.

Para a denominação dos tipos de vírus *Influenza*, são adotadas as diretrizes da OMS para nomenclatura, representadas sequencialmente, pela espécie do vírus ao qual pertence (A, B ou C), em caso de origem animal – a espécie no qual o vírus foi isolado, lugar do isolamento (cidade ou país), número do isolado, o ano do isolamento, e, em caso de vírus *Influenza A* os subtipos de hemaglutinina (H1-H17) e neuraminidase (N1-N9) devem ser adicionados entre parênteses. Por exemplo, o vírus que causou a pandemia de 2009 teve a cepa referenciada como: *Influenza A*/California/04/2009 (H1N1) (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; SULLIVAN et al, 2010; TAUBENBERG E MORENS, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

4.2.2. Estrutura viral e organização do genoma viral

A morfologia primária do vírus *Influenza* revelou que estes vírus são frequentemente pleomórficos e após passagens *in vitro*, mostraram-se esféricos, com diâmetro de 80 a 120 nm. No entanto, partículas filamentosas com estrutura alongada (mais de 300 nm) têm sido observadas particularmente em isolados clínicos a fresco. Na figura 3, ambas as formas encontram-se ilustradas (MITTELHOLZER, 2006; PALESE E SHAW, 2007).

Esses vírus são envelopados por uma dupla camada lipídica que deriva da membrana plasmática da célula hospedeira. O envelope lipoprotéico é caracterizado por

projeções na superfície viral (figura 3.A) constituídas por duas estruturas glicoprotéicas: HA (trimérica) e NA (tetramérica) que possuem aproximadamente de 10 a 14 nm de comprimento, com uma proporção de quatro HA para cada uma NA (PALESE E BOUVIER, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

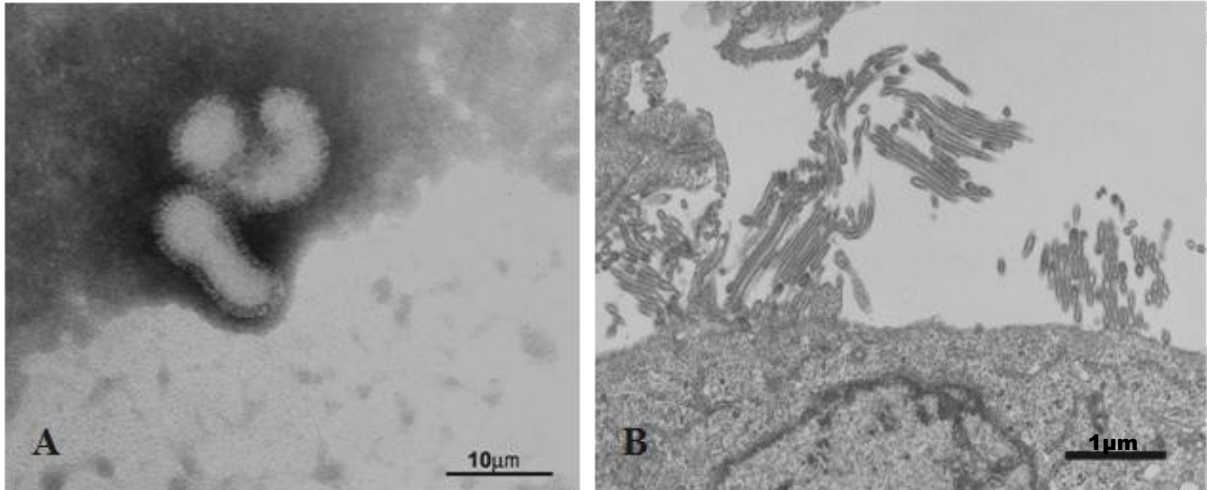


FIGURA 3. Micrografia eletrônica do vírus *Influenza A (H1N1)* pandêmico cultivado em cultura de células de rim de canino (MDCK). **A.** Morfologia esférica apresentando as projeções da superfície viral. **B.** As partículas virais apresentando a forma filamentososa de mais de 1 μm de comprimento.

Fonte: Figura 2.A, Laboratório de Vírus Respiratórios e Unidade de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas. Figura 2.B, Neumann e Kawaoka, 2009.

Em número menor que a HA e NA, o canal de prótons M2 (proteína tetramérica), também atravessa o envelope lipídico (figura 4), com uma proporção de 10^1 canais de prótons M2 para 10^2 moléculas de HA. O envelope e as suas três proteínas integrais de membrana (HA, NA e M2) sobrepõem-se à proteína de matriz M1 (figura 4), envolvendo o core viral (PALESE E BOUVIER, 2008).

A proteína de matriz M1 forma uma camada interna ao envelope lipídico, envolvendo a proteína de exportação nuclear (NEP, também chamada de proteína não-estrutural 2, NS2) e o complexo ribonucleoproteico (RNP). Este complexo consiste em segmentos de RNA viral, revestidos com nucleoproteína (NP) e com a heterotrimérica RNA polimerase dependente de RNA, a qual é composta por duas polimerases “básicas” - a PB1 (polimerase básica 1) e a PB2 (polimerase básica 2) - e uma polimerase “ácida” (PA - polimerase ácida). A proteína não-estrutural 1 (NS1) é abundantemente encontrada no núcleo das células infectadas. Essas proteínas estão demonstradas na figura 4 (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; PALESE E SHAW, 2007; WEBSTER et al, 1992).

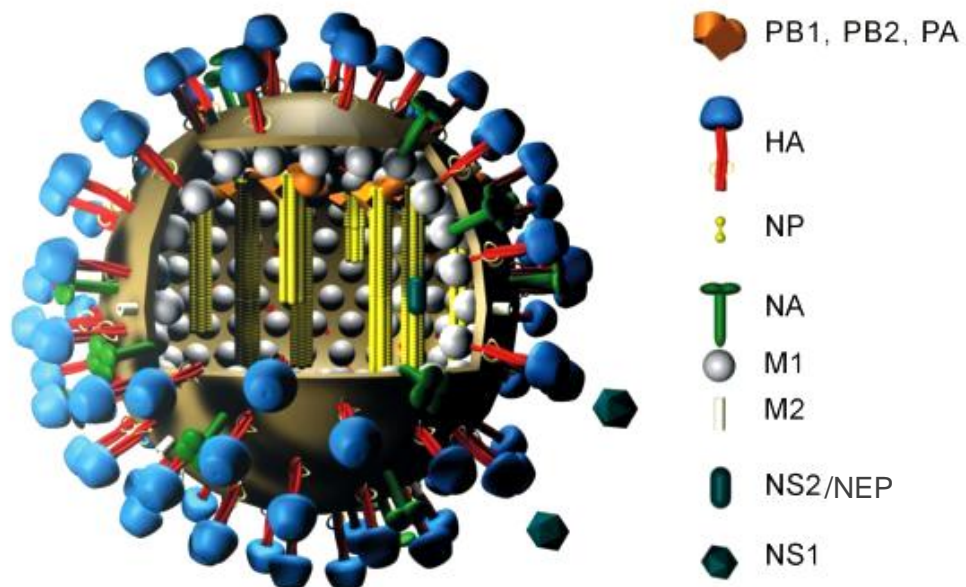


FIGURA 4. Representação esquemática da partícula viral do vírus *Influenza* demonstrando o aspecto morfológico, e as suas respectivas proteínas: Polimerase Básica 1 (PB1); Polimerase Básica 2 (PB2); Polimerase Ácida (PA); Hemaglutinina (HA); Nucleoproteína (NP); Neuraminidase (NA); Proteína de matriz 1 (M1); Proteína de matriz 2 (M2); Proteína não estrutural 1 (NS1) e Proteína não estrutural 2 (NS2/NEP)

Fonte: Eickmann, 2006.

O genoma do vírus *Influenza A* consiste em 13.588 nucleotídeos, distribuídos em oito segmentos de RNA de fita simples e polaridade negativa. Os oito segmentos de RNA codificam 11 produtos gênicos reconhecidos: as polimerases PB1, PB2 e PA, PB1-F2, HA, NA, M1 e M2, NP e as proteínas NS1 e NS2/NEP (figura 4 e 5) (PALESE E SHAW, 2007; WEBSTER et al, 1992).

Os oito segmentos do vírus *Influenza A* são numerados em ordem decrescente de comprimento (figura 5). Os segmentos genômicos e seus respectivos produtos, bem como suas funções encontram-se listadas no quadro 1 (PALESE E BOUVIER, 2008).

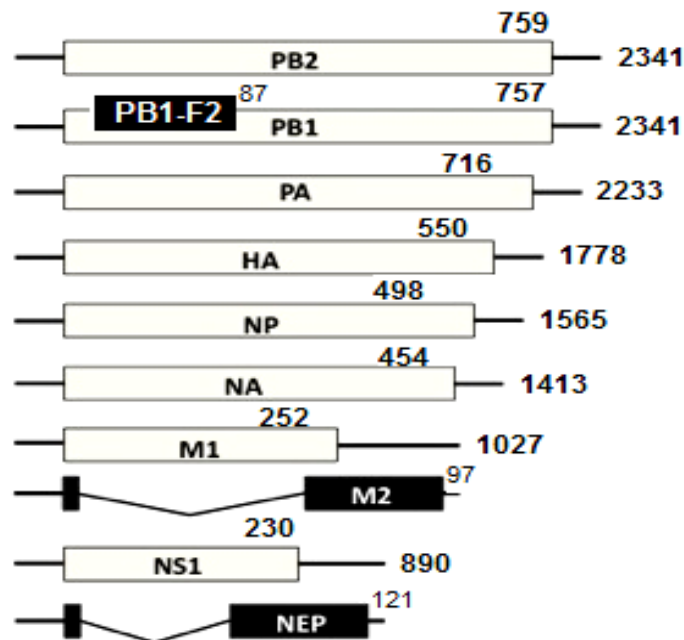


FIGURA 5. Esquema representativo do genoma do vírus *Influenza A*. Cada um dos retângulos representa um segmento de RNA (sentido positivo) e sua proteína codificada. Os tamanhos, em aminoácidos e em nucleotídeos, respectivamente, estão representados pelos algarismos localizados nas extremidades.

* PB2: Polimerase Básica 2; PB1: Polimerase Básica 1; PB1-F2: Polimerase Básica 1 *frame 2*; PA: Polimerase Ácida; HA: Hemaglutinina; NP: Nucleoproteína; NA: Neuraminidase; M1: Proteína de matriz 1; M2: Proteína de matriz 2; NS1: Proteína não estrutural 1; NS2/NEP: Proteína não estrutural 2.

Segmento	Tamanho (nt*)	Tamanho (aa*)	Proteína	Função
1	2341	759	Polimerase básica 2 (PB2)	Componente da RNA polimerase, desempenha papel na iniciação da transcrição do RNAm viral, através do reconhecimento e ligação do <i>cap</i> dos mRNAs do hospedeiro.
2	2341	757	Polimerase básica 1 (PB1)	Componente da RNA polimerase, catalisa a adição sequencial dos nucleotídeos durante o alongamento da cadeia de RNA. PB1 também é responsável pela ligação com as extremidades terminais de ambos os RNAv e RNAc para a iniciação da transcrição e replicação. A interação com a extremidade 3' do RNAv ativa a atividade endonucleásica da PB1, gerando o <i>iniciador</i> requerido para a síntese do RNAm.
		87	PB1- frame 2 (PB1-F2)	Pode ter um papel na modulação na resposta do hospedeiro acelerando a morte de células imunes.
3	2233	716	Polimerase ácida (PA)	Componente do complexo polimerase, sua função específica ainda não está clara, mas têm sido descritas mutações que afetam a transcrição e replicação, indicando o possível papel em ambos os processos.
4	1778	550	Hemaglutinina (HA)	Ligação aos receptores da célula hospedeira e fusão entre o envelope viral e membrana endossomal.
5	1565	498	Nucleoproteína (NP)	Ligação e encapsidação do RNA viral associada as três proteínas do complexo polimerase.
6	1413	454	Neuraminidase (NA)	Facilita a liberação do vírus das células infectadas pela clivagem do ácido siálico, libera a progênie viral dos receptores da célula hospedeira.
7	1027	252	Proteína de matriz 1 (M1)	Forma um escudo em torno do nucleocapsídeo, embaixo do envelope viral. Desempenha um papel importante na montagem e empacotamento viral.
		97	Proteína de matriz 2 (M2)	Parece agir como um canal de prótons controlando o pH do Complexo de Golgi durante a síntese de HA e permitir a acidificação durante desencapsulamento do vírus
8	890	230	Proteína não estrutural 1 (NS1)	É abundante na célula infectada, principalmente no núcleo, onde regula a exportação nuclear de RNAm; proteína antagonista do interferon
		121	Proteína não estrutural 2 (NS2 / NEP)	Exportação de RNAv do núcleo para o citoplasma

QUADRO 1. Proteínas codificadas pelos segmentos de RNA do vírus *Influenza A*.

Fonte: Couceiro e Albuquerque, 2008; Palese e Shaw, 2007 e Webster et al, 1992.

*nt: nucleotídeos

*aa: aminoácidos

4.2.3. Replicação viral

O ciclo replicativo do vírus *Influenza* inicia-se quando uma partícula viral entra em contato com a célula alvo. A ligação entre o vírus e a célula é possível devido a afinidade que a hemaglutinina possui com os receptores de ácido siálico na superfície da célula hospedeira (PALESE E BOUVIER, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

A ligação da HA aos receptores induz a entrada do vírus na célula por endocitose. Os endossomas são acidificados no citoplasma até pH = 5.0, o que provoca a exposição do peptídeo de fusão da HA contido na porção HA2 (CHAIPAN et al, 2009; PALESE E BOUVIER, 2008).

A acidificação do endossoma através dos canais iônicos (proteínas M2), contribui para o desempacotamento, uma vez que destabiliza as proteínas de matriz (M1). Todos os segmentos da partícula viral são transportados para o núcleo celular onde são transcritos com auxílio dos três polipeptídios da RNA polimerase que estão associados a cada segmento. O RNA viral é então copiado em mRNA usando os *cap* dos pré-mRNA da célula hospedeira, os quais são usados como iniciadores para a polimerização. Todos os mRNA são transportados para o citoplasma. No caso dos mRNA provenientes dos segmentos sete e oito e que codificam as proteínas NS1/NS2 e M1/M2 podem ainda sofrer *splicing* (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; PALESE E SHAW, 2007; WEBSTER et al, 1992).

As proteínas HA e NA são glicosiladas no Complexo de Golgi. Todos os outros mRNAs vão ser traduzidos por ribossomos citoplasmáticos. As proteínas PA, PB1, PB2 e NP são importadas para o núcleo onde catalisam a síntese de toda a cadeia (+) de RNA complementar e RNA viral (RNA_v, polaridade negativa), formando-se posteriormente vários fragmentos de nucleocapsídeos. Algumas das novas cadeias (-) de RNA sintetizadas entram para a via de síntese de novos mRNAs (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; PALESE E SHAW, 2007; WEBSTER et al, 1992).

As proteínas M1 e NS1 são também transportadas para o núcleo. A ligação da proteína NS1 a novos RNAs virais induz a parada da síntese dos mesmos e, em conjunto com a proteína NS2, promove a exportação dos novos nucleocapsídeos para o citoplasma. As proteínas HA, NA e M2 são transportadas para a superfície da célula sendo incorporadas na membrana plasmática, formando posteriormente o envelope. Os nucleocapsídeos víricos

ligam-se às proteínas M1 e NS2, e são transportadas para a superfície celular associando-se às regiões da membrana plasmática que contém as proteínas de membrana. O empacotamento é completado pela incorporação (“*budding*”) da membrana plasmática que ao fechar-se liberta os vírions recém-sintetizados. Todo o processo de replicação está representado na figura 6 (PALESE E BOUVIER, 2008; PALESE E SHAW, 2007; ZHANG et al., 2009).

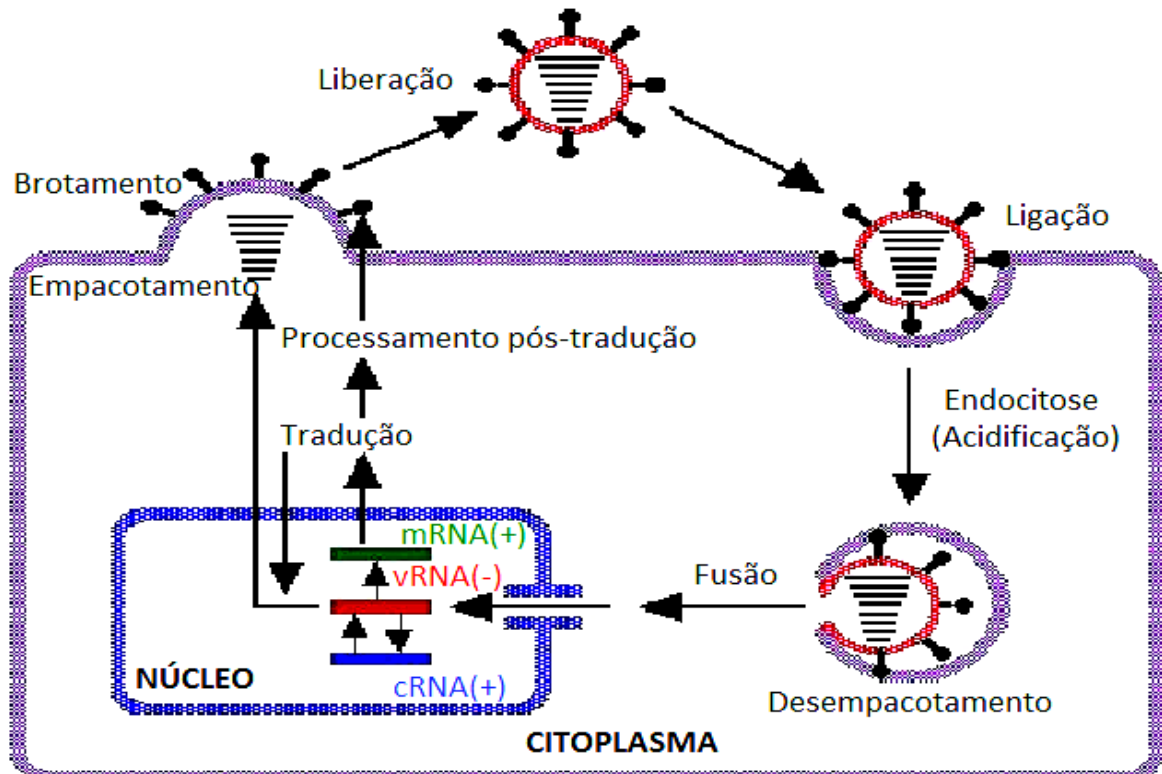


FIGURA 6. Representação simplificada da replicação do vírus *Influenza*.

mRNA(+): RNA mensageiro (polaridade positiva);

vRNA(-): RNA viral (polaridade negativa);

cRNA(+): RNA complementar (polaridade positiva).

Fonte: Martins et al, 2000.

4.2.4. O vírus *Influenza A* em suínos

Vários estudos têm sugerido o papel dos suínos na emergência das pandemias: (1) os suínos são naturalmente e experimentalmente infectados por vírus aviários; (2) as células epiteliais da traquéia desses animais contêm receptores tanto do tipo humano que

preferencialmente ligam-se ao ácido siálico que é ligado a galactose por uma ponte $\alpha 2,6$ (AS $\alpha 2,6$ Gal) quanto do tipo aviário que reconhecem AS $\alpha 2,3$ Gal ; (3) *in natura*, replicam vírus aviários que pode passar a reconhecer os receptores do tipo humano ($\alpha 2,6$); (4) vírus resultantes dos rearranjos genéticos entre vírus suínos e aviários podem infectar humanos; e (5) cepas com perfil genético exclusivo de suínos têm sido estabelecidas há várias décadas em diversos continentes (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; WRIGHT et al, 2007).

O vírus suíno clássico H1N1 predominou entre as populações suínas da América do Norte até 1998, contudo o vírus H3N2 com triplo rearranjo (humano/aviário/suíno) surgiu com ampla propagação dentro das populações de suínos da América do Norte. Este vírus continha os genes da HA, NA e PB1 de origem humana; genes NP, M e NS do suíno clássico, e genes PB2 e PA de origem norte-americana de vírus aviário. O novo H3N2 suíno tinha uma patogenicidade incomum associada com aborto espontâneo e até mesmo morte dos suínos (SCHNITZLER E SCHNITZLER et al., 2009).

Estas cepas com triplo rearranjo que surgiram nas populações de suínos da América do Norte em 1997-1998 contribuiu posteriormente para os progenitores dos vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico 2009 (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER et al., 2009).

4.2.5. Variabilidade Antigênica

O vírus *Influenza* apresenta considerável variabilidade antigênica nas suas proteínas de superfície, sobretudo nos vírus *Influenza* do tipo A. Tal variabilidade é contínua ao longo do tempo, o que contribui para o escape ao sistema imunológico do animal hospedeiro, especialmente o homem. Em contraste com a maioria dos outros vírus respiratórios, o vírus *Influenza* possui dois diferentes mecanismos que lhe permite a reinfeção em humanos – o *Drift* e o *Shift* antigênicos.

O *Drift* antigênico (figura 7) é resultado do acúmulo de mutações pontuais no genoma dos vírus *Influenza A* e B, o que leva à mudança gradual da antigenicidade das proteínas HA e NA. Em mamíferos, variantes genéticas e antigênicas resultam da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico do hospedeiro. O *drift* antigênico também tem sido observado entre aves domésticas, embora em menor grau do que em humanos. As

substituições aminoacídicas na HA e NA de vírus humanos ocorrem com frequência menor do que 1% ao ano (SULLIVAN et al, 2010; WRIGHT et al, 2007).

O *Shift* antigênico (figura 7) refere-se a uma mudança mais abrupta da antigenicidade viral, quando novos subtipos da HA e/ou NA são introduzidos na população humana. Durante o século passado, quatro *shifts* antigênicos ocorreram: em 1918 com o aparecimento do vírus H1N1; em 1957 quando o subtipo H1N1 foi substituído pelo vírus H2N2; em 1968 quando o vírus H3N2 substituiu o H2N2 circulante (WEBSTER, 2002; WRIGHT et al, 2007).

Essa mudança antigênica radical é causada em geral por rearranjos genéticos, entre vírus *Influenza* de diversas origens animais. Isto acontece quando duas estirpes virais diferentes invadem uma mesma célula hospedeira, resultando na formação de vírus híbridos. Visto que o homem apresenta pequena ou nenhuma imunidade para estas novas estirpes virais, seu potencial de disseminação na população é grande (WRIGHT et al, 2007).

O *shift* antigênico também pode ser originado a partir da transmissão direta de um vírus de origem animal, sem que sofra rearranjos genéticos. Embora não seja conclusivo, evidências filogenéticas sugerem que a gripe espanhola foi causada pela introdução de um vírus aviário na população humana (WRIGHT et al, 2007).

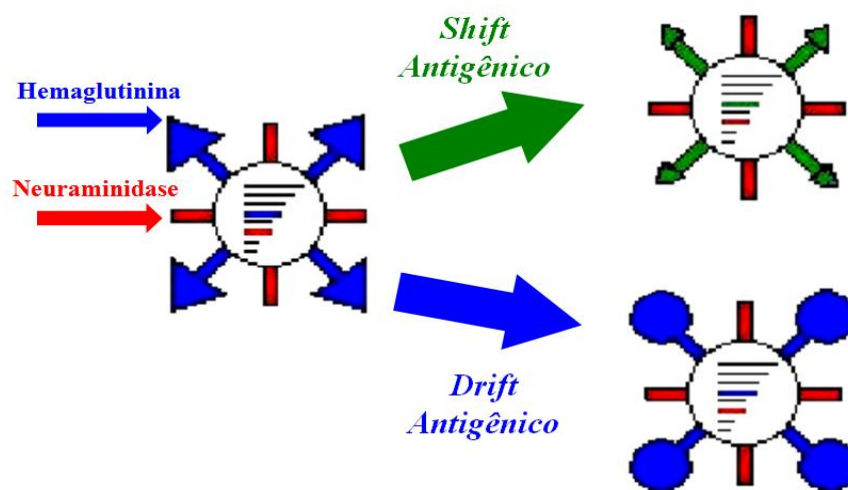


FIGURA 7. Ilustração esquemática do *Drift* e *Shift* antigênico.
Fonte: Martins et al, 2000.

A proteína HA é o maior componente antigênico do vírus. Para os vírus H1, os sítios antigênicos são designados em cinco classes: Sa, Sb, Ca1, Ca2, e Cb (figura 8), esses sítios estão localizados na extremidade globular da HA um simples ponto de mutação em um dos sítios antigênicos da HA pode ser o suficiente para uma variação antigênica (PALESE E BOUVIER, 2008; WRIGHT et al, 2007).

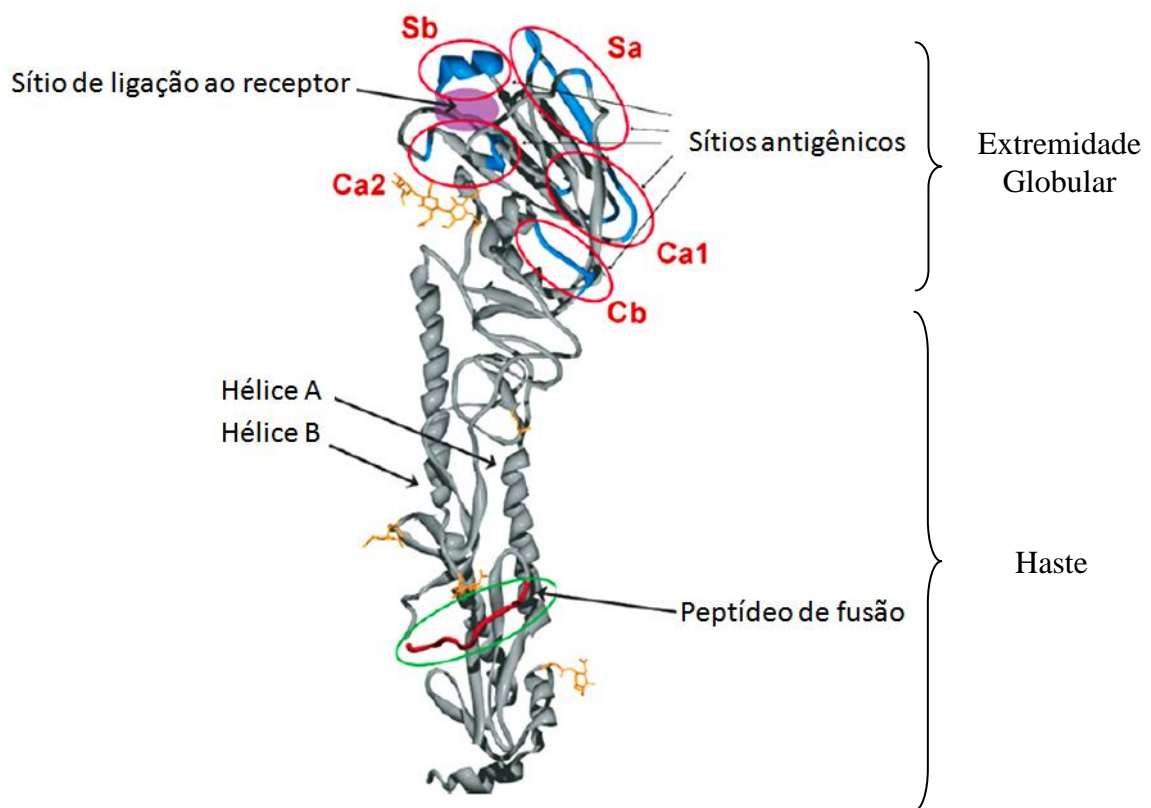


FIGURA 8. Imagem de um monômero de hemaglutinina da pandemia de 1918 (H1N1). A cabeça globular (porção superior) contém o sítio de ligação aos receptores ácidos siálicos, que é cercado por cinco sítios antigênicos (Sa, Sb, CA1, CA2, e Cb). A haste (porção inferior) é composto pelas hélices A e B e o peptídeo de fusão.
Fonte: Palese e Bouvier, 2008

4.2.6. Determinantes moleculares de patogenicidade

A patogenicidade do vírus da gripe é multigênica, e os determinantes moleculares diferem entre os vírus de diferentes espécies animais. Três proteínas do vírus *Influenza* têm sido identificadas como os maiores determinantes de patogenicidade desses vírus, são elas: HA, PB2 e NS1 (WRIGHT et al., 2007).

4.2.6.1. Papel da Hemaglutinina na patogenicidade viral

A proteína HA tem um importante papel na expressão de alta patogenicidade do vírus *Influenza* em muitas espécies animais. Como já foi citado anteriormente, ela media a ligação do vírus às células hospedeiras, e a fusão subsequente entre o envelope viral e a membrana endossômica para posterior liberação da vRNP no citoplasma, tais funções lhe atribuem um papel crítico no ciclo viral (NEUMANN E KAWAOKA, 2006; 2009).

A especificidade da clivagem da HA é determinada pela sequência de aminoácidos no sítio de clivagem (Q-R/K-X-R/K-R, onde X é um aminoácido ácido) (WRIGHT et al., 2007). Os vírus aviários de baixa patogenicidade possuem um único resíduo de arginina no local de clivagem, o qual é reconhecido por proteases extracelulares que são secretadas pelas células do trato respiratório e intestinal limitando consequentemente a infecção nessa localização o mesmo ocorre em vírus humanos no trato respiratório. Vírus aviários altamente patogênicos – H5 e H7 – possuem múltiplos aminoácidos básicos no ponto de clivagem, os quais são reconhecidos por proteases intracelulares onipresentes, desse modo desencadeando infecções sistêmicas (NEUMANN E KAWAOKA, 2006; 2009; WRIGHT et al., 2007).

A restrição da replicação viral a determinadas espécies animais pode ser explicada em parte pela diferença na especificidade de ligação da HA ao receptor celular. Os vírus da gripe em humanos preferencialmente ligam-se ao receptor de ácido siálico que é ligado a galactose por uma ponte $\alpha 2,6$ (SA $\alpha 2,6$ Gal). Tais receptores estão presentes em maior quantidade em células epiteliais na traquéia humana (figura 9). Por outro lado, os vírus aviários preferencialmente reconhecem SA $\alpha 2,3$ Gal (figura 9) presentes essencialmente, na superfície de células epiteliais do trato intestinal de aves aquáticas. Em humanos, ligações do

tipo -2,3 são em geral menos abundantes, sendo mais encontradas no trato respiratório inferior (bronquíolo e alvéolo). Essa especificidade dos vírus em humanos e aves é a maior responsável pela barreira de espécie e a mudanças no grau e tipo de fixação entre a HA e o receptor pode dar origem a um vírus potencialmente pandêmico. (PALESE E BOUVIER, 2008; WRIGHT et al, 2007).

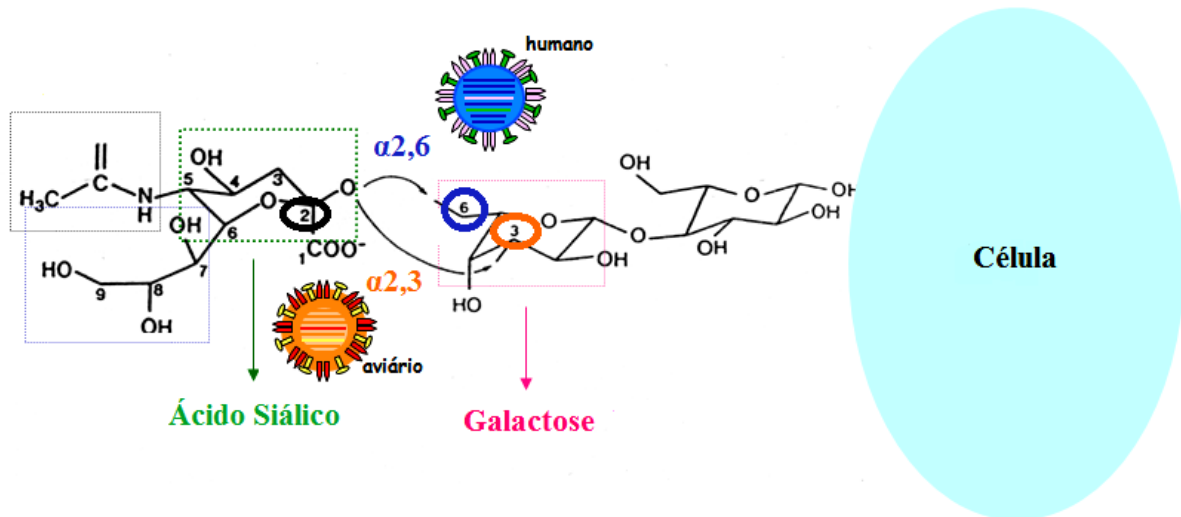


FIGURA 9. Ilustração da ligação entre o vírus *Influenza* e o ácido siálico em ligação α 2,3 e α 2,6. O carbono-2 terminal do ácido siálico podem se ligar ao carbono-3 ou -6 da galactose, formando ligações do tipo 2,3 ou 2,6.

Fonte: Adaptado de Zambon, 2007.

Estudos sobre a especificidade da HA ao receptor e sobre análise cristalográfica identificaram resíduos de aminoácidos que determinam a especificidade do receptor: glutamina na posição 226 (Gln-226), encontrada em vírus aviários, determina a especificidade para SA α 2,3Gal, enquanto que Leucina na mesma posição (Leu-226) da H3 e H2 de vírus humanos se associa a fixação viral sobre SA α 2,6Gal. Em todos os vírus humanos (com poucas exceções durante a pandemia da gripe asiática) Leu-226 está associado a Serina na posição 228 (Ser-228), enquanto que em vírus aviários Gln-226 está associado com Glicina na posição 228 (Gly-228). Para vírus H1, o ácido aspártico na posição 190 (Asp-190), encontrado em vírus isolados de humanos e suínos, e ácido glutâmico na mesma posição (Glu-190), encontrado em vírus isolados de aves determina preferencialmente ligações com

$\alpha 2,6$ ou $\alpha 2,3$, respectivamente (NEUMANN E KAWAOKA, 2006; 2009; WEBSTER et al., 1992).

4.2.6.2. Papel da proteína PB2 na patogenicidade viral

Como componente do complexo da polimerase viral, a PB2 é uma proteína essencial para a replicação viral. Estudos de genética reversa têm demonstrado que Lys na posição 627 da PB2 determina alta patogenicidade ao vírus H5N1 em camundongos, enquanto que Glu nesta mesma posição está associada a baixa patogenicidade. No entanto, a natureza do aminoácido na posição 627 não afeta o tropismo celular, mas sim a sua capacidade de replicação em camundongos e, provavelmente, em seres humanos. Quanto aos vírus pandêmicos de 2009, estes possuem aminoácidos na posição 627 que não estão relacionados com alta patogenicidade. (NEUMANN E KAWAOKA, 2006; 2009; SUBBARAO et al., 1993; WRIGHT et al., 2007).

O vírus que possui Lys-627 na PB2 cresce eficientemente no trato respiratório superior de mamíferos, uma vez que a Lys nessa posição confere eficiente replicação a 33°C (temperatura das vias aéreas superiores em humanos), diferente da PB2-Glu 627. Por outro lado, ambas as variantes replicam eficientemente a 37°C. Esses achados sugerem que PB2-Lys 627 permite uma replicação eficiente tanto no trato respiratório inferior quanto no superior em mamíferos, característica que facilita a transmissão (NEUMANN E KAWAOKA, 2006; 2009).

4.3. VÍRUS *Influenza A* (H1N1) PANDÊMICO

4.3.1. Origem genética

O vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico contém uma combinação de segmentos gênicos que nunca foi anteriormente relatada em suínos ou em outros vírus responsáveis por gripe humana. Provavelmente são resultantes de um rearranjo genético entre os vírus H3N2 humano, H1N1 suíno clássico e H1N1 aviário Norte americano com o vírus suíno geneticamente próximo aos aviários da Eurásia (isto é, rearranjo viral triplo aviário/suíno/humano). Como resultado, esses vírus possuem: genes PB2 e PA originais de

vírus aviários da América do Norte; PB1 do H3N2 humano; HA (H1), NP e NS originais de vírus suínos H1N1 clássicos da América do Norte; e NA (N1) e M provenientes de vírus H1N1suínos similares aos da Eurásia, vale ressaltar que os segmentos virais PB1 (tipo humano), PB2 e PA (tipo aviário) foram incorporados em vírus suínos já em 1997-1998, quando um vírus suíno de rearranjo triplo foi isolado pela primeira vez (GARTEN ET AL., 2009; NEUMANN E KAWAOKA, 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009).

A figura 10 resume as etapas de rearranjo genético assim como a origem dos genes do vírus (H1N1) pandêmico 2009.

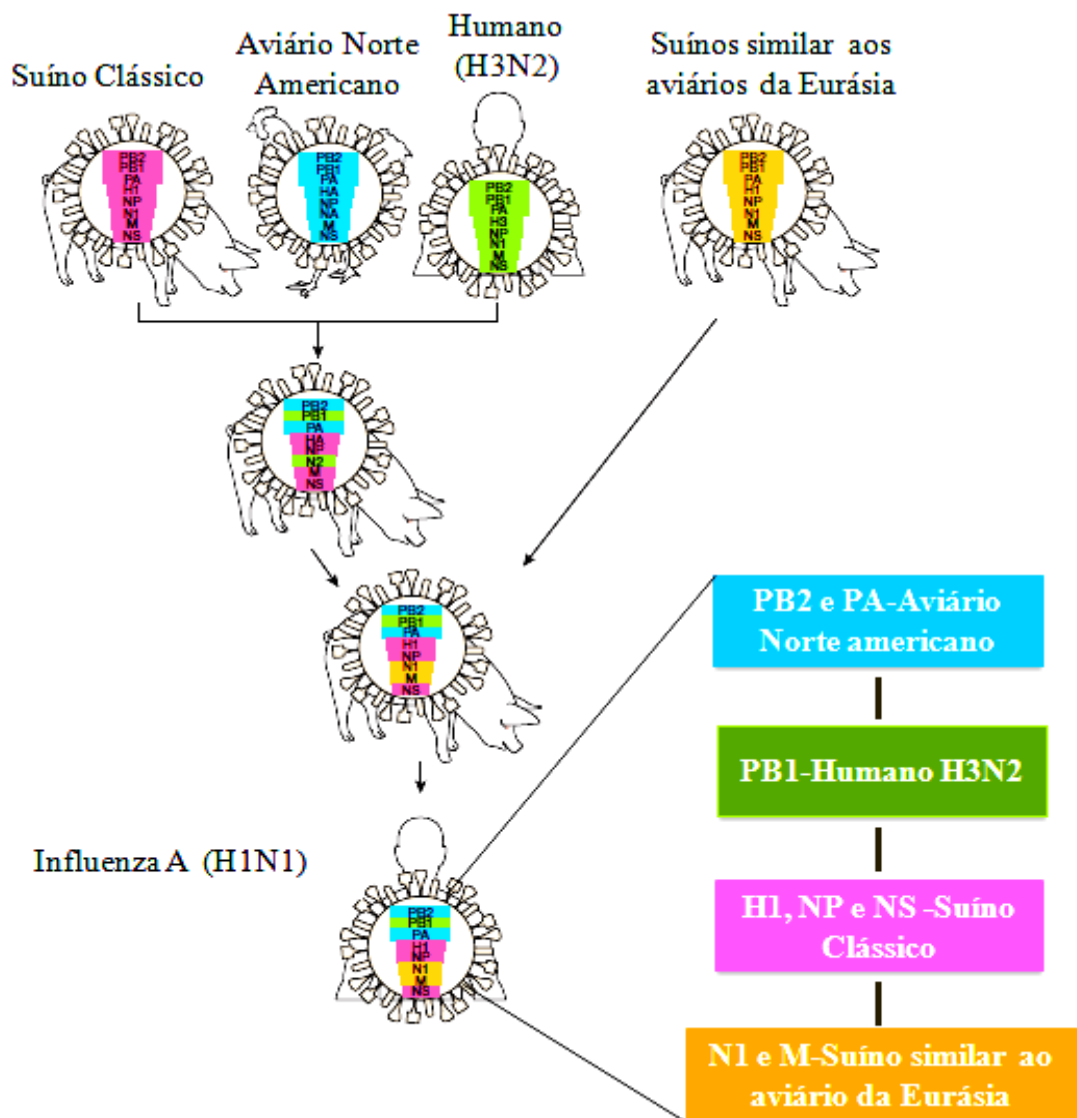


FIGURA 10. Gênese do vírus *Influenza A (H1N1)* pandêmico 2009.
Fonte: Adaptado de Neumann e Kawaoka, 2009.

4.3.2. Aspectos Clínicos da Gripe

A pandemia pelo vírus (H1N1) 2009 difere em sua patogenicidade da gripe sazonal em dois aspectos fundamentais. Primeiro, a maioria da população humana tinha pouca ou nenhuma imunidade pré-existente ao vírus, desse modo o impacto da infecção ocorre em especial entre crianças e adultos jovens. Além disso, o vírus infectava também o trato respiratório inferior o que podia favorecer o desenvolvimento de pneumonia rapidamente progressiva.

Os sintomas mais comumente relatados na gripe incluem tosse, febre, dor de garganta, dores musculares, mal estar geral e cefaléia. Alguns doentes apresentam sintomas gastrintestinais (náuseas, vômitos e/ou diarreia). Durante a pandemia de 2009 aproximadamente 10-30% dos pacientes internados em alguns países precisaram ser admitidos em unidade de terapia intensiva (UTI). Os pacientes criticamente enfermos incluíam aqueles que tiveram o comprometimento rápido e progressivo das vias respiratórias inferiores, insuficiência respiratória e síndrome respiratória aguda grave (SRAG) com hipoxemia refratária. Outras complicações sérias incluem infecção bacteriana secundária invasiva, choque séptico, insuficiência renal, disfunção de múltiplos órgãos, miocardite, encefalite, e agravamento das condições de doença crônica subjacente, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica ou insuficiência cardíaca congestiva (GILL et al., 2010).

De acordo com o manual de manejo clínico de infecção humana pelo vírus pandêmico (H1N1) da OMS, a doença respiratória causada pelo vírus pandêmico é considerada moderada quando os sintomas incluíam: (1) febre, tosse, odinofagia, rinorréia, cefaléia, dores musculares e mal-estar, sem dispnéia; (2) distúrbios gastrintestinais também podiam estar presentes, como a diarreia e/ou vômito, especialmente em crianças, mas sem evidência de desidratação.

O quadro era considerado grave quando: (1) Apresentavam sinais clínicos (dispnéia, taquipnéia, hipoxia) e/ou radiológicos da doença do trato respiratório inferior (pneumonia, por exemplo), envolvimento do sistema nervoso central (SNC) (encefalopatia, encefalite), desidratação grave, e/ou complicações secundárias, tais como insuficiência renal, insuficiência de múltiplos órgãos e choque séptico. Outras complicações incluíam rabdomiólise e miocardite; (2) Exacerbação da doença subjacente crônica, incluindo asma,

doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência hepática ou renal crônica, diabetes ou outras doenças cardiovasculares; (3) Qualquer outra condição ou apresentação clínica necessitando de internação hospitalar para tratamento clínico.

Os fatores de risco para doença grave estavam relacionados aos seguintes grupos: mulheres grávidas; pessoas de qualquer idade com doença pulmonar crônica (asma, por exemplo); com doença cardíaca (insuficiência cardíaca congestiva); doenças metabólicas (diabetes, por exemplo); doença renal e/ou hepática crônica, certas condições neurológicas (incluindo neuromuscular, cognitiva, distúrbios e apreensão), hemoglobinopatias ou imunossupressão, quer devido a condições de imunossupressão primária, como a infecção pelo HIV, ou as condições secundárias, como a medicação imunossupressora ou malignidade; as crianças que recebem terapia crônica com aspirina e pessoas com 65 anos ou mais (SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009; SULLIVAN et al., 2010).

4.3.3. Substituições aminoacídicas associada à gravidade

Várias substituições aminoacídicas nos genes codificadores da hemaglutinina e PB2 do vírus *Influenza A* (H1N1) pandêmico têm sido encontradas, no entanto, apenas algumas foram associadas a virulência. Essas substituições estão mais bem descritas a seguir.

4.3.3.1. Hemaglutinina (HA)

Algumas substituições aminoacídicas associadas com a antigenicidade ou patogenicidade do vírus, no gene da HA tem sido relatadas. Recentemente, a OMS tornou público que uma simples substituição do ácido aspártico por uma glicina na posição 222 da HA (D222G) do vírus pandêmico A (H1N1) 2009, associava-se a casos graves e fatais em vários países. Vários estudos sugeriram essa associação entre a substituição D222G e casos graves da doença (KILANDER,2010; MAK, 2010; MILLER, 2010).

No estudo de Puzelli e colaboradores (2010), entretanto foram detectados quatro vírus com HA contendo D222G dos 169 casos, sendo três (52) provenientes de casos graves e

fatais e um caso (117) moderado. Segundo a OMS, a prevalência da substituição D222G é menor que 1,8%, e dos 364 casos fatais analisados 26 (7,1%) continham essa substituição.

Resultados preliminares de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a substituição D222G tem a tendência de acontecer sob pressão seletiva, e essa mutação de um único aminoácido aumenta drasticamente a capacidade de replicação do vírus *in vitro* e patogenicidade *in vivo* (XU et al., 2010).

Estudos sobre o tipo de tropismo celular com os vírus A (H1N1) pandêmico 2009 contendo a substituição D222G demonstraram um padrão distinto ao tropismo celular típico onde os vírus *Influenza A* e *B* infectam predominantemente células não ciliadas ricas em ligações do tipo SA α 2,6Gal (presentes no trato respiratório superior). Os vírus mutantes, em contraste, infectaram tanto células não ciliadas como as células ciliadas e 20% ou mais das células ciliadas infectadas expressavam receptores do tipo SA α 2,3Gal - principalmente presentes no trato respiratório inferior - em quantidade relativamente maior nas células do epitélio traqueobrônquico e sobre as células dos bronquíolos e alvéolos, contribuindo para a gravidade da infecção pulmonar. Este fato foi correlacionado com a presença da substituição D222G na HA, uma vez que o vírus mutante apresentou tropismo celular de 5 a 10 vezes maior na infecção de células ciliadas sendo que outras diferenças de aminoácidos, em particular D222E, apresentaram pouco ou nenhum efeito (CHUTINIMITKUL et al., 2010; LIU et al., 2010).

Em paralelo, outras substituições nesta mesma posição têm sido relatadas, tais como a troca do ácido aspártico pelo ácido glutâmico (D222E) ou pela asparagina (D222N), mas a significância clínica dessas substituições ainda não é conhecida (KILANDER et al, 2010; MAK et al, 2010; MILLER et al, 2010; PUZELLI et al, 2010).

Outros estudos sobre a análise das sequências do vírus isolado de amostras de autópsias indicaram que 42,9% dos indivíduos que morreram de casos confirmados da gripe pandêmica (H1N1) foram infectados com vírus que continham a substituição Q310H na região da HA. Em geral, seis (86%) dos sete isolados de vírus a partir das amostras de necropsia teve pelo menos uma substituição aminoacídica dentro das regiões 301-316 ou 219-240 da HA. Durante a segunda onda da pandemia de 2009, houve um aumento no número de casos de vírus mutante isolados com substituições aminoacídicas dentro de ambas as regiões da HA. As substituições dentro da região 219-240, na posição 239 (D239→E/G/N) foram

relatadas com maior frequência. Além disso, os mutantes D239G foram detectados com maior frequência nos vírus isolados de pulmões de pacientes com desfechos fatais. Nesse mesmo estudo, vários isolados virais com substituições na HA 301-316 (I312V e P314S) foram documentados (GLINSKY, 2010).

Além destes, outro estudo desenvolvido por Pan e colaboradores (2010) e Garten e colaboradores (2009) demonstraram que na posição 206, localizada no domínio de ligação da HA ao receptor, houve uma substituição de Serina por Treonina (S206T) a qual afeta diretamente a infectividade e transmissibilidade do vírus (H1N1) pandêmico 2009 em humanos. O quadro 2 resume as substituições aminoácídicas relatada na HA do vírus H1N1 pandêmico.

Posição	Substituição *	Resultado	Referência
222	Asp → Gly	Aumenta a capacidade de replicação <i>in vitro</i> e patogenicidade <i>in vivo</i> ; Tropismo celular de 5 a 10 vezes maior na infecção de células ciliadas (SA α 2,3Gal);	Kilander et al, 2010; Mak et al, 2010; Miller et al, 2010; Puzelli et al, 2010; Xu et al., 2010; Liu et al., 2010; Chutinimitkul et al., 2010.
222	Asp → Glu	Significância clínica ainda desconhecida	Kilander et al, 2010; Mak et al, 2010; Miller et al, 2010; Puzelli et al, 2010.
222	Asp → Asn	Significância clínica ainda desconhecida	Kilander et al, 2010; Mak et al, 2010; Miller et al, 2010; Puzelli et al, 2010.
310	Gln → His	Encontrado em 42,9% dos indivíduos que morreram devido infecção pelo vírus <i>Influenza A</i> (H1N1)	Glinsky, 2010.
239	Asp → Gly	Encontrada em HA de isolados virais de pulmões de pacientes com desfechos fatais.	Glinsky, 2010.
206	Ser → Thr	Afeta diretamente na infectividade e transmissibilidade do vírus A (H1N1) pandêmico 2009 em humanos.	Garten et al., 2009; Pan et al., 2010.

QUADRO 2. Substituições aminoácídicas encontradas na HA do vírus *Influenza A* pandêmico relacionado ao possível resultado.

*Asp: Ácido Aspártico; Gly: Glicina; Glu: Ácido Glutâmico; Asn: Asparagina; Gln: Glutamina; His: Histidina; Ser: Serina e Thr: Treonina

4.3.3.2. Proteína PB2

Os vírus da gripe que se originam de espécies aviárias são susceptíveis em adquirir mudanças em seus aminoácidos para se adaptarem e replicarem de modo eficiente em outras espécies animais. Duas mudanças aminoacídicas na proteína PB2 são conhecidas: um ácido glutâmico pela lisina na posição 627 (E627K) e um ácido aspártico pela asparagina na posição 701 (D701N). O ácido glutâmico na posição 627 (E627) da PB2 confere ao vírus uma replicação viral mais restrita em células humanas, resultando em baixa patogenicidade. Uma mudança adaptativa neste resíduo de ácido glutâmico para lisina (627K) confere altos níveis de atividade da polimerase em células humanas, levando à alta patogenicidade viral. Essas mudanças permitem que os vírus da gripe de origem aviária repliquem de forma eficiente em células humanas. Curiosamente, a PB2 do vírus A (H1N1) pandêmico a qual é de origem aviária, não codifica os aminoácidos K627 e N701 (NEUMANN E KAWAOKA, 2009; YAMADA et al. 2010).

Buscando compreender essa diferença, Mehle e Doudna (2009) e Yamada e colaboradores (2010) demonstraram que nas análises das sequências dos genes PB2 do vírus A (H1N1) pandêmico foi identificado um par de aminoácidos conservados, que são extremamente raros nos vírus sazonais, uma serina na posição 590 e arginina na posição 591, polimorfismo denominado SR. Para todos os isolados, o polimorfismo SR foi visto somente em concomitância com a variante E627. A modelagem molecular dessas variantes na estrutura de domínio PB2 627 prevê a justaposição de R591 e E627, sugerindo que estes dois tipos de resíduos podem interagir (figura 11).

Para investigar o papel do polimorfismo SR quanto à função da polimerase foi utilizado um ensaio de atividade de polimerase, onde o polimorfismo SR em PB2 foi isolado a partir do vírus (H1N1) 2009 e transformado para a sequência consenso. A remoção do polimorfismo SR reduziu a atividade da polimerase em cerca de 50%, sugerindo um potencial papel na adaptação específica ao hospedeiro. Ainda no ensaio de atividade da polimerase, o mesmo foi realizado a 33°C indicando que o efeito do polimorfismo SR sobre a função da polimerase também ocorre na temperatura do trato respiratório superior de humanos. O polimorfismo SR aumentou a atividade da polimerase contendo PB2 E627, mas não aumentou a atividade da polimerase PB2 contendo K627. Estes dados ofereceram uma

explicação para a replicação eficiente do vírus (H1N1) e, potencialmente, patogenicia, em seres humanos.

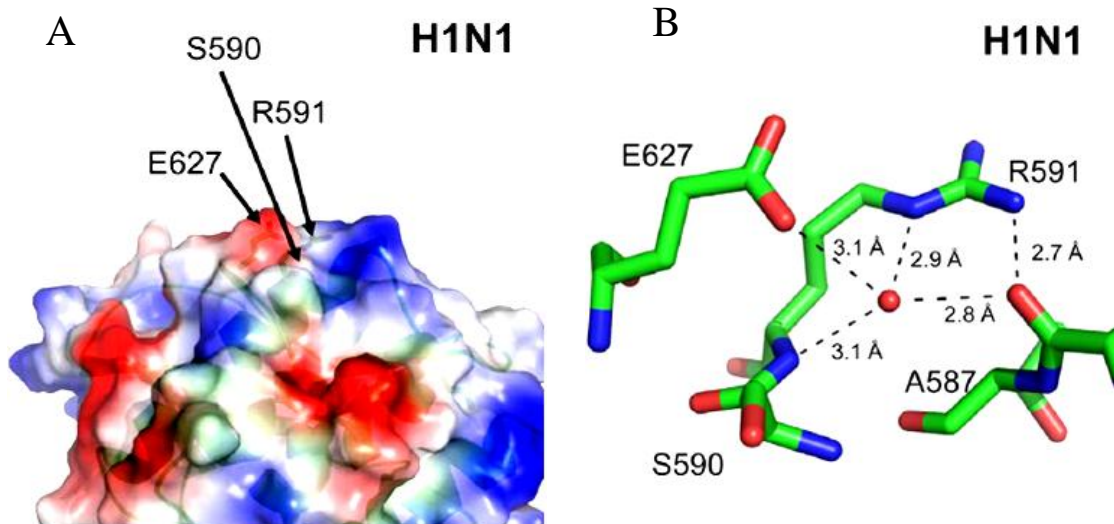


FIGURA 11. Estrutura cristalográfica da proteína PB2 com os resíduos E627, S590 e R591 do vírus (H1N1) pandêmico. **A.** A cor azul = carga positiva relativa, vermelha = carga relativa negativa. Resíduo S590, R591 e E627 são identificados com setas pretas. **B.** As interações do R591 com os resíduos vizinhos. Em verde = carbono, vermelho = oxigênio e azul = nitrogênio. O Resíduo S590 está por detrás da E627 e bloqueia a liberdade de conformação de E627. Å = Angstrom; --- = Pontes de Hidrogênio
Fonte: Yamada et al., 2010.

Além do exposto acima, o estudo promovido por Bussey et al (2010), relatou que a elevada atividade da polimerase da cepa pandêmica em células de mamíferos é, em parte, dependente do resíduo 271 da PB2, indicando claramente que a substituição aminoacídica da treonina pela alanina nesta posição reforça a atividade da polimerase em células humanas e contribui para o crescimento viral em mamíferos, conseqüentemente contribuindo para a patogenicidade viral.

Concomitante a essas pesquisas, recentemente, a OMS noticiou em seu boletim epidemiológico semanal que está sendo observada outra substituição na proteína PB2 de uma lisina por uma asparagina na posição 340 (K340N) do vírus A (H1N1) pandêmico. Essa substituição tem sido obtida de casos moderados, graves e fatais em vários países.

4.3.4. Transmissão

De acordo com a OMS (2009), o vírus *Influenza* é transmitido de pessoa a pessoa, principalmente por meio da tosse ou do espirro e através do contato com secreções respiratórias de pessoas infectadas. A relativa contribuição de cada uma dessas vias é desconhecida, mas, parece estar associada a outros fatores tais como a umidade e temperatura (SULLIVAN et al, 2009). O período de transmissibilidade da doença é diferente entre adultos e crianças. Nos adultos, o período é até sete dias após o aparecimento dos sintomas, enquanto em crianças este período vai de dois dias antes até 14 dias após o início dos sintomas.

4.3.5. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial do vírus *Influenza* constitui uma importante ferramenta para a saúde pública. Existe uma variedade de métodos laboratoriais para detecção do vírus, os quais incluem técnicas para isolamento viral, detecção de antígenos virais, detecção do ácido nucléico e os testes sorológicos que permitem a detecção de anticorpos gerados frente à infecção pelo vírus (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008).

O diagnóstico para o vírus pandêmico (H1N1) 2009 foi realizado pelos centros nacionais de referência para vigilância do vírus *Influenza* (CNR). No Brasil, existem três centros credenciados pela OMS como CNR, são eles: o Instituto Evandro Chagas no Pará (IEC/PA), o Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (IOC/RJ) e o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo (IAL/SP). O Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas é responsável por 10 estados das regiões norte e nordeste: Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, e pelo estado do Mato Grosso do Sul, totalizando 11 estados.

Segundo o manual de manejo clínico de infecção humana com o vírus pandêmico (H1N1) da OMS, durante a pandemia - considerando a urgência - o diagnóstico preferencial adotado foi a detecção do ácido nucléico através da reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real, tendo em vista que este método proporciona a detecção mais rápida e sensível da infecção.

O sucesso do diagnóstico laboratorial depende essencialmente da qualidade do espécime clínico, tempo de coleta, das etapas de transporte e armazenamento até seu processamento no laboratório. Os espécimes clínicos a serem coletados para o diagnóstico são amostras respiratórias que incluem a secreção nasofaríngea (SN), aspirado nasofaríngeo (ANF) e *swab* combinado (SC) que para detecção e caracterização de vírus *Influenza* devem ser colhidos, preferencialmente, nos três primeiros dias após o início dos sintomas.

Deve-se considerar a colheita das amostras para o isolamento viral, em particular, de pacientes graves, o qual pode ser feito em ovos embrionados e cultivo celular (OMS, 2009). No sistema de isolamento em ovos, são utilizados ovos com embriões de 10 a 11 dias, nos quais é inoculado o espécime clínico (ANF, SN, SC) nas cavidades alantóica e amniótica. Já a replicação do vírus *Influenza* em cultivo celular, geralmente é feita em células de origem canina (MDCK), que é uma linhagem contínua de células que apresentam em sua superfície ácidos siálicos com ligações $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ com a galactose subjacente. A demonstração da proliferação viral em ovos embrionados ou em cultura de células é feita a partir da técnica de hemaglutinação (WRIGHT et al, 2007) .

O diagnóstico utilizando testes rápidos da gripe foi disponibilizado comercialmente em muitas partes do mundo. No entanto, estudos indicaram que esse teste possui baixa sensibilidade, o que limitava seu uso. Os testes de diagnóstico rápido podem ser utilizados em uma situação de surto em potencial, pois podem dar uma indicação da presença do vírus na comunidade o que orienta a tomada de decisões de saúde pública, na ausência de testes confirmatórios em tempo útil por métodos mais sensíveis (SULLIVAN et al., 2009).

4.3.6. Tratamento

Embora a vacinação seja a ferramenta de primeira escolha para a prevenção da gripe, os antivirais específicos são agentes importantes no tratamento desta doença. Atualmente, existem dois tipos de antivirais específicos: os inibidores da proteína M2 (Amantadina e Rimantadina) e os inibidores da neuraminidase viral (Zanamivir, Oseltamivir, Peramivir e Laninamivir) (NEUMANN E KAWAOKA, 2006; 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009). Enquanto os primeiros só são ativos contra os vírus *Influenza* de tipo

A, os inibidores da neuraminidase são eficazes também contra os vírus de tipo B (WRIGHT et al, 2007).

Nos últimos anos, os inibidores de neuraminidase viral se tornaram um alvo atraente para o desenvolvimento de agentes antivirais. O oseltamivir (Tamiflu®) representa o protótipo dos inibidores da neuraminidase e foi o medicamento recomendado pela OMS (2009), para o tratamento da gripe pandêmica A H1N1.

No homem, em relação à amantadina e à rimantadina, a emergência de variantes resistentes é observada rapidamente em 2-5 dias, em cerca de 30% dos pacientes tratados. Quanto aos inibidores da neuraminidase, estes só são eficazes se prescritos nas primeiras 48h da doença, ou em caso de infecção persistente em indivíduos imunodeprimidos. A emergência de variantes resistentes a estas drogas vem sendo relatada (GUBAREVA et al., 2001, LE et al., 2005).

Pelo fato de apresentarem um espectro mais amplo, uma melhor tolerância e um potencial reduzido na emergência de cepas resistentes que os inibidores da M2, os antineuraminidase representam um avanço considerável na terapêutica da gripe (GUBAREVA et al., 2000; MOSCANA, 2005).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal retrospectivo de caráter descritivo e analítico.

5.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população total do estudo constituía-se de 1.524 amostras positivas para o vírus *Influenza A (H1N1) pdm*. Destas, 739 amostras foram provenientes da região de estudo, a mesorregião metropolitana de Belém (figura 12) que de acordo com a resolução da Presidência do IBGE nº. 11, de 5 de junho de 1990, é composta pela microrregião de Belém (Ananindeua, Barcarena, Belém, Benevides, Marituba e Santa Bárbara do Pará) e microrregião de Castanhal (Bujaru, Castanhal, Inhangapi, Santa Isabel e Santo Antônio do Tauá).

As amostras representativas para este estudo foram aquelas oriundas de pacientes com síndrome respiratória aguda grave (SRAG), caracterizada por febre, tosse e dispneia (Ministério da Saúde, 2010) sem nenhuma comorbidade relatada, triadas pela Rede de Vigilância da Gripe, de ambos os sexos e diferentes faixas etárias (0 a 96 anos) correspondendo desta forma 350 amostras (figura 12). Nas quais 246 amostras, compreendem o período das duas ondas (figura 12) (agosto, setembro e outubro de 2009 e fevereiro, março e abril de 2010). Todos os casos de óbitos foram analisados independentemente de ter ou não comorbidade.

5.3. TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral (n) foi realizado considerando o nível de confiança de 95%, erro amostral de 3% e frequência da substituição aminoacídica na população de 1,8% descrita pela OMS (2010), onde foi alcançado o número mínimo de 76 amostras a serem testadas. Portanto, as tentativas de isolamento viral em cultura de células MDCK foram efetuadas aleatoriamente e sem reposição a partir do universo de 246 amostras, no qual se obteve 87 amostras virais isoladas (figura 12).

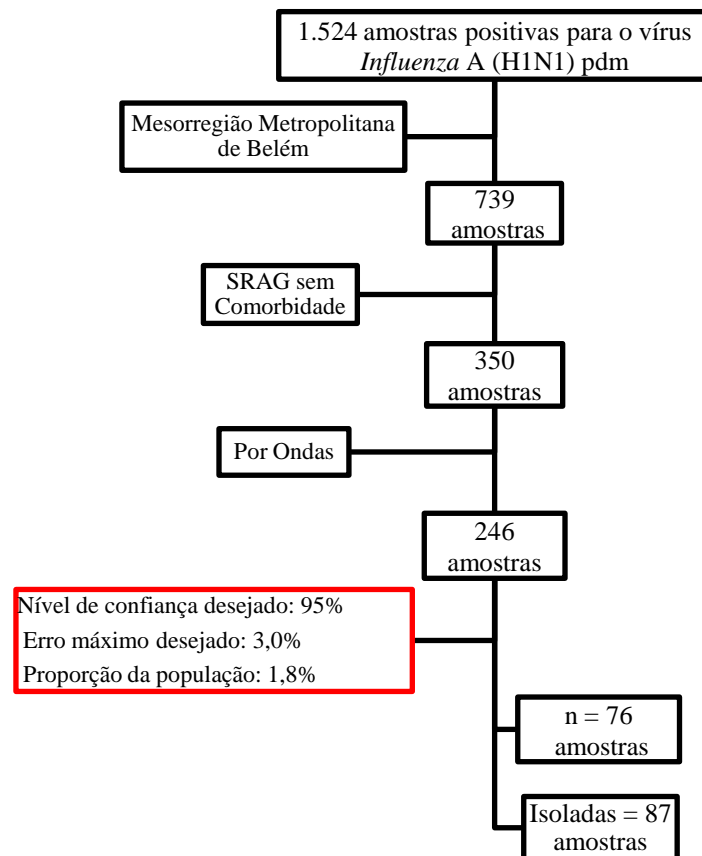


FIGURA 12. Figura esquemática para demonstrar a estimativa do tamanho amostral para a população em questão.

5.3.1. Critérios de Inclusão

Amostras clínicas de pacientes pertencentes a ambos os sexos e diferentes faixas etárias, atendidos em unidades de saúde com quadro clínico de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) caracterizada pela presença de febre, tosse e dispnéia, acompanhada ou não de outros sintomas, que foram ou não hospitalizados, e com diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus *Influenza A (H1N1) pdm* positivo.

5.3.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que não correspondiam à área de estudo, com comorbidade e que não compreendem ao período das duas ondas (agosto, setembro e outubro de 2009 e fevereiro, março e abril de 2010).

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O modelo estatístico utilizado para as análises neste trabalho foi o teste de Regressão Logística Simples para determinar a *dependência* de uma variável em relação à chamada variável *independente* ou preditora, com a finalidade de verificar se as substituições tiveram alguma relação com período da pandemia, hospitalização, sexo e idade. A regressão logística simples testa uma variável dependente Y e uma variável independente, sendo a variável Y binária, ou seja, assume valores 1 (sucessos) e valores 0 (insucessos), ou seja, a substituição aminoacídica é um evento dicotômico, que pode ser entendido como 1 quando ocorre e 0 quando esta não ocorre.

5.5. COLETA DAS AMOSTRAS

Durante a pandemia, os espécimes clínicos foram obtidos a partir de aspirado nasofaríngeo ou *swab* combinado (narina/garganta) realizados por uma equipe especializada do Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA), a partir de pacientes que apresentavam sinais e sintomas de gripe com até sete dias de evolução, atendidos em unidades de saúde de Belém.

A coleta do aspirado nasofaríngeo foi realizada com auxílio de uma bomba a vácuo acoplada a um tubo coletor contendo meio de transporte (Hanks e gelatina a 0,5%). O cateter do tubo coletor foi delicadamente introduzido nas cavidades nasais e orofaríngeas do paciente, aspirando assim a secreção. A realização do *swab* combinado (SC) consistiu em friccionar o swab contra a mucosa nasal, sendo utilizado um *swab* para cada narina e outro para a garganta. Todos foram colocados em um tubo contendo meio de transporte, devidamente identificado com o nome do paciente e a data de coleta. Após a coleta os espécimes foram encaminhados, sob refrigeração (4°C), ao Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas (IEC).

5.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas, as amostras foram homogeneizadas e fragmentadas em duas alíquotas devidamente rotuladas com o

número do registro, natureza do espécime clínico (SC ou SNF) e data da coleta. Todas as alíquotas foram mantidas a -70°C.

5.7. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL (vRNA)

O RNA_v foi extraído a partir do espécime clínico utilizando-se o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante, que consiste em três etapas principais: lise, lavagem e eluição. O RNA eluído foi estocado a -70°C ou imediatamente utilizado para a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR).

5.8. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL

A detecção do genoma viral foi realizada por qRT-PCR de acordo com protocolo preconizado pela Organização Mundial da Saúde (2009). Nesta etapa foram utilizados detectores (iniciadores e sonda) específicos (quadro 3) para genes do vírus *Influenza A H1N1*: Influenza A (InfA), Influenza A Suíno universal (swFluA), Influenza Suínos H1 (swH1) e RNaseP (RP).

Iniciador e Sonda	Sequência (5' - 3')	Concentração
InfA Forward	gac cra tcc tgt cac ctc tga c	40 µM
InfA Reverse	agg gca tty tgg aca aak cgt cta	40 µM
InfA Probe ¹	tgc agt cct cgc tca ctg ggc acg	10 µM
SW InfA Forward	gca cgg tca gca ctt aty ctr ag	40 µM
SW InfA Reverse	gtg rgc tgg gtt ttc att tgg tc	40 µM
SW InfA Probe ²	cya ctg caa gcc ca"t" aca cac aag cag gca	10 µM
SW H1 Forward	gtg cta taa aca cca gcc tyc ca	40 µM
SW H1 Reverse	cgg gat att cct taa tcc tgt rgc	40 µM
SW H1 Probe ²	ca gaa tat aca "t"cc rgt cac aat tgg ara a	10 µM
RnaseP Forward	aga ttt gga cct gcg agc g	40 µM
RnaseP Reverse	gag cgg ctg tct cca caa gt	40 µM
RnaseP Probe ¹	ttc tga cct gaa ggc tct gcg cg	10 µM

QUADRO 3. Sequência de iniciadores e sondas utilizadas na RT-PCR em tempo real para detecção de vírus Influenza A (H1N1) pdm.

¹ Sondas TaqMan ® apresentando duas porções fluorescentes, uma localizada na extremidade 5' chamada de apresentador (*Reporter, R*) com uma molécula de 6-carboxifluoresceína (FAM) e outra na extremidade 3' chamada de capturador de energia (*Quencher, Q*), Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc. Novato, CA).

² Sondas TaqMan ® marcadas na região 5'-terminal com FAM e na região terminal 3' há internamente um resíduo "T" modificado com BHQ1 para evitar a extensão da sonda pela Taq polimerase.

O iniciador e sonda da Rnase P tem como função detectar RNase P de gene humano e, portanto, serve como controle interno positivo para ácido nucléico humano, fornecendo como um controle secundário que valida o procedimento de extração dos ácidos nucléicos e integridade dos reagentes. Os controles positivos (RNA de H1 pdm) e negativos (água) foram incluídos em cada reação. A reação foi realizada com o *kit comercial SuperScript III TM One-step qRT-PCR com Platinum Taq®- (Invitrogen Life Technologies)* para um volume final de 25µl, contendo 20µl de *mix* onde a quantidade de cada reagente a ser adicionado para cada iniciador e sonda estão descritas no quadro 4.

Reagentes	Volume por reação
Água livre de nuclease (<i>Water free DNase/ RNase</i>)	N x 5.5 µl
Iniciador <i>Forward</i>	N x 0.5 µl
Iniciador <i>Reverse</i>	N x 0.5 µl
Sonda	N x 0.5 µl
SuperScript™ III RT/Platinum® <i>Taq Mix</i>	N x 0.5 µl
Master Mix PCR 2X	N x 12.5 µl
Volume total	N X 20.0 µl

QUADRO 4. Descrição do volume de cada reagente que deve constituir a *mix* por reação.

* N = número de amostras + controle positivo e negativo

A reação de amplificação foi conduzida inicialmente por uma transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, seguida da ativação da Taq polimerase a 95 °C por 2 minutos e da amplificação pela reação em cadeia da polimerase de 45 ciclos a 95 °C a 15 segundos e 55°C por 30 segundos.

Ao término da amplificação, todas as amostras clínicas deveriam apresentar curvas de reação RP que cruzem a linha limite igual, ou antes, de 37 ciclos, sugerindo assim a presença de RNA suficiente de RNase P do gene humano, indicando que o espécime é de qualidade aceitável.

A amostra foi considerada positiva para o vírus *Influenza A (InfA)* quando a respectiva curva de crescimento cruzou a linha limite igual, ou antes, de 37 ciclos. Se a reação para a gripe A foi positiva, poderia ser positivo para o vírus A Suíno universal (swFluA) e para o H1 Suíno (swH1). Portanto, a amostra foi considerada positiva para o vírus Influenza A (H1N1) pdm se tanto as curvas de crescimento para InfA, como swFluA e swH1 cruzaram a linha limite no prazo de 37 ciclos, como demonstra o quadro 5.

	InfA	swFluA	swH1	RP	Resultado
Amostra	+	+	+	+	Influenza A H1N1 pdm
Amostra	+	-	-	+	Influenza A Sazonal
Amostra	-	-	-	+	Negativo
Amostra	-	-	-	-	Amostra inadequada

QUADRO 5. Interpretação dos resultados por RT-PCR em tempo real.

5.9. ISOLAMENTO VIRAL

As tentativas de isolamento viral foram efetuadas a partir do universo alcançado – segundo os critérios de inclusão e exclusão (descritos nos itens 5.2.1, 5.2.2 e 5.3) – de 246 amostras, destas os espécimes foram escolhidos aleatoriamente e sem reposição, e foram inoculados diretamente em placas e/ou garrafas de cultivos celulares da linhagem contínua de células de rim canino (MDCK - *Madin Darbin Canine Kidney*), sensíveis ao crescimento do vírus *Influenza*. A fim de aumento do título viral, cada amostra foi submetida até, no máximo, três passagens. As culturas foram observadas diariamente ao microscópio óptico invertido, na procura de evidências do crescimento viral. Adicionalmente, a cada quatro dias, uma amostra do fluído da cultura foi testada quanto à presença de atividade hemaglutinante (HÁ) indicativa de proliferação viral. Os sobrenadantes das amostras positivas foram então estocados a -70°C para testes de identificação posterior, pela Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR).

Esses cultivos foram mantidos em laboratório à temperatura de aproximadamente 37°C em garrafas plásticas de 25 cm^3 contendo Meio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) acrescido de bicarbonato de sódio na concentração de $1,5\text{ g/L}$, soro bovino fetal 10%, L-glutamina 4 mM , HEPES 10 mM , penicilina $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ e estreptomicina $100\text{ }\mu\text{g/ml}$. Semanalmente, as células foram transferidas para novas garrafas, processo este denominado de repique celular ou tripsinização. Para a inoculação dos espécimes foram preparadas placas, as quais, após a inoculação, foram mantidas com o meio de manutenção (menor concentração de soro bovino comparado ao meio de crescimento e acréscimo de anfotericina B) adicionado de tripsina cristalina $2\text{ }\mu\text{g/ml}$.

5.10. TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO (HÁ)

O teste de HÁ foi realizado após o isolamento viral em cultura de células e consiste em analisar a capacidade hemaglutinante dos vírus *Influenza*, isto é, a capacidade que o vírus tem de ligar-se e aglutinar hemáceas. Este teste é utilizado para indicar a presença e a concentração do vírus no material analisado.

Desse modo, são utilizadas microplacas (96 orifícios) de fundo em “V” para a realização do teste com hemáceas de peru. Primeiramente adicionar 25 µL do diluente (PBS Ph 7.2) em todos os orifícios da placa com exceção do primeiro orifício. No primeiro orifício adiciona-se 50 µL do sobrenadante celular inoculado e 25 µL desse sobrenadante no 2° e 3° orifícios. Então se realiza a diluição a partir do 3° orifício da microplaca. Após a diluição acrescenta-se 25 µL de PBS do 3° ao 12° orifício, inclusive o controle de hemácia. E por final, adiciona-se 50 µL de hemácia de peru (diluídas 1:200 em PBS pH:7.2) em todos os orifícios. As placas são agitadas ligeiramente e são deixadas incubando por 30 minutos a temperatura ambiente, observando e determinando a mais alta diluição em que o vírus ocasiona a hemaglutinação completa das hemácias.

5.11. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

A caracterização genética dos vírus foi desenvolvida utilizando-se 4 etapas principais: a) extração do RNA viral (RNA_v) provenientes do cultivo celular infectado; e b) amplificação dos genes codificadores da HA e PB2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR); c) purificação e quantificação do produto da RT-PCR; d) sequenciamento dos genes de interesse pelo método de Sanger.

5.11.1. Extração do RNA viral – vRNA

A extração do RNA viral foi realizada a partir do cultivo celular infectado utilizando-se o *PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen Life Technologies)*. O RNA eluído foi estocado a -70°C ou imediatamente submetido a RT-PCR.

5.11.2. Amplificação dos genes codificadores da HA e PB2.

A amplificação dos genes codificadores da HA e PB2 foi realizada por RT-PCR convencional. A RT-PCR em um único tubo foi realizada utilizando-se Kit comercial *SuperScript III™ One-step qRT-PCR with Platinum Taq® (Invitrogen Life Technologies)* e oligonucleotídeos iniciadores, recomendados pela OMS, específicos para o gene da hemaglutinina (quadro 6) e PB2 (quadro 7) do vírus A (H1N1) pdm para um volume final de 25µL, contendo, 5µL de RNAv, 0.2µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol/µL), 12.5µL de tampão de reação 2X (contendo 0.4mM de cada dNTP, 2.4mM de MgSO₄), 0.5µL de mix RT/Taq (*SuperScript™ RT/Platinum Taq*), e 6.5µL de água livre de nuclease (*Water free DNase/RNase*). Em seguida, a mistura foi submetida a transcrição reversa a 48C°/45', 94C°/2' e PCR com 30 ciclos de 94C°/20'', 50C°/30'' e 72C°/1'.

Iniciadores	Sequência (5'- 3')	Tamanho do amplicon
HA/+1	tgt aaa acg acg gcc agt ata cga cta gca aaa gca ggg g	460 pb
HA/-/461	cag gaa aca gct atg acc tca tga ttg ggc cay ga	
HA/+351	tgt aaa acg acg gcc agt acr tgt tac ccw ggr gat ttc a	592 pb
HA/-/943	cag gaa aca gct atg acc gaa akg gga grc tgg tgt tta	
HA/+379	tgt aaa acg acg gcc agt acr tgt tac cca ggr gat ttc	825 pb
HA/-/1204	cag gaa aca gct atg acc tct tta ccy act rct gtg aa	
HA/+736	tgt aaa acg acg gcc agt agr atg rac tat tac tgg ac	604 pb
HA/-/1340	cag gaa aca gct atg acc ttc tke att rta wgt cca aa	
HA/+1124	tgt aaa acg acg gcc agt tgg atg gta ygg tta yca yca	417 pb
HA/-/1541	cag gaa aca gct atg acc tca taa gty cca ttt ytg a	
HA/+1204	tgt aaa acg acg gcc agt aag atg aay acr car ttc aca g	574 pb
HA/-/1778	cag gaa aca gct atg acc gtg tca gta gaa aca agg gtg ttt	

QUADRO 6. Sequências de iniciadores utilizados na RT-PCR para o gene da hemaglutinina.

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon
PB2/+1	tgt aaa acg acg gcc agt ctc gag caa aag cag gtc aa	574 pb
PB2/-/575	cag gaa aca gct atg acc yag ctg tga ytc yga tgt	
PB2/+328	tgt aaa acg acg gcc agt gtr aca tgg tgg aay aga a	488 pb
PB2/-/816	cag gaa aca gct atg acc gct ttg rtc aay atc rtc att	
PB2/+487	tgt aaa acg acg gcc agt cct ggt cay gca gac ctc ag	532 pb
PB2/-/1019	cag gaa aca gct atg acc cca aar ctg aag gay gar ctg at	
PB2/+713	tgt aaa acg acg gcc agt caa gca gtr trt aca ttg aag t	576 pb
PB2/-/1289	cag gaa aca gct atg acc cct cta act gct ttt ayc atg caa t	
PB2/+946	tgt aaa acg acg gcc agt ccr acw gaa gaa caa gct gt	563 pb
PB2/-/1509	cag gaa aca gct atg acc gga gta ttc atc yac acc cat	
PB2/+1169	tgt aaa acg acg gcc agt aag caa cca gra gat tgr ttc a	571 pb
PB2/-/1740	cag gaa aca gct atg acc ctg aga cca ytg aat ttt rac a	
PB2/+1447	tgt aaa acg acg gcc agt cca agy acm gag atg tca atg aga	739 pb
PB2/-/2186	cag gaa aca gct atg acc ttr ctc art tca ttg atg ct	
PB2/+1683	tgt aaa acg acg gcc agt caa cac tta tca atg gat aat	658 pb
PB2/-/2341	cag gaa aca gct atg acc tag tag aaa caa ggt cgt t	

QUADRO 7. Sequências de iniciadores utilizados na RT-PCR para o gene PB2.

Ao término da amplificação, os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado por *Gel Red Nucleic acid stain (Biotium)*, em tampão 1X tris-acetato-EDTA (TAE), inicialmente por 5 minutos a 80 volts (V), seguido de 25 minutos a 110V. O marcador de peso molecular *200 lines SmartLadder (Eurogentec)* foi aplicado em cada gel. A visualização dos amplicons foi realizada em transilumidor com luz ultravioleta (UV) e fotografado com auxílio do sistema de captura de imagem E-capt (*Vilber Loumart*).

5.11.3. Purificação e quantificação do produto RT-PCR

Nas amostras que apresentaram a banda de interesse, foi realizada a purificação do produto da RT-PCR, utilizando o kit comercial *MEGAquick-spin PCR & AGAROSE GEL DNA EXTRACTION (Bioeasy)*, seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do DNA para a determinação da concentração do mesmo foi realizada seguindo instruções do fabricante do marcador de peso molecular *Low Mass Ladder (Invitrogen)*. A concentração de cada amostra foi determinada comparando-se a intensidade das bandas do marcador com as bandas das amostras, sendo o resultado expresso em nanogramas (ng).

5.11.4. Sequenciamento dos genes codificadores da HA e PB2.

O Sequenciamento dos genes codificadores da HA e PB2 foi realizado pelo Método de Sanger. O método de bloqueio de cadeia descrito por SANGER et al. (1977) que tem como fundamento o emprego de dideoxynucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos, foi realizado com o Kit *Big Dye® terminator Cycle Sequencing v 3.1* (Applied Biosystem) e foi composta pela mistura de DNA viral amplificado (10-50 ng), *Big Dye* contendo os dideoxynucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, tampão de reação, iniciadores específicos senso e reverso (2.5 pmol/ μ L) (quadro 8) e se necessário água para volume final de 10 μ L. A mistura foi submetida a 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 20 segundos, hibridização dos iniciadores a 50°C por 15 segundos e síntese a 60°C por quatro minutos.

Iniciador	Sequências (5'-3')
M13 Senso	tgt aaa acg acg gcc agt
M13 Reverso	cag gaa aca gct atg acc

QUADRO 8. Sequência de iniciadores utilizados na reação de sequenciamento para os genes HA e PB2.

5.11.4.1. Precipitação da Reação de Sequenciamento

A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada pela adição de 40 μ L de isopropanol a 65% diluído em água livre de RNase, sendo incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugados a 4.000 rpm durante 45 minutos a temperatura de 20°C. Posteriormente, o isopropanol é cuidadosamente removido e o volume de 200 μ L de etanol a 70% foi adicionado. Uma nova etapa de centrifugação foi realizada durante 20 minutos a 4.000 rpm, objetivando a precipitação do DNA contendo os dideoxynucleotídeos marcados. Finalmente, o etanol foi removido, e a placa submetida a 95°C durante cinco minutos para completa evaporação do etanol.

5.11.4.2. Eletroforese em sequenciador automático

O DNA precipitado foi reconstituído em 15 μ L formamida *high dye* (pH 7,0). Após ser submetido à etapa de choque térmico a 95°C por dois minutos, objetivando a quebra

de estruturas secundárias que possam impedir a correta separação dos fragmentos de DNA marcados; a placa com o DNA reconstituído em formamida foi submetida à eletroforese em capilar de 36 cm. Para cada 16 amostras, a eletroforese em sequenciador automático ABI Prism 3130xl (Applied Biosystem) foi realizada durante aproximadamente uma hora e meia, quando então os fragmentos de DNA marcados foram separados de acordo com seus tamanhos (diferença de um nucleotídeo entre cada fragmento), detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda, e interpretados pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao passarem pela região de leitura ótica do sequenciador.

5.11.4.3. Edição, alinhamento e análise das sequências.

As sequências nucleotídicas obtidas para os segmentos HA e PB2 referentes ao vírus *Influenza*, foram editadas e analisadas utilizando-se o programa *Geneious Pro* (Biomatters, Nova Zelândia). As mesmas foram comparadas entre si e com sequências de diferentes vírus pertencentes ao gênero *Influenzavirus A* da família *Orthomyxoviridae* que estão disponíveis no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como, com a cepa vacinal A/Califórnia/07/2009(H1N1) para verificação da ocorrência de substituições aminoacídicas.

5.12. MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS

A sequência primária de uma proteína determina sua estrutura tridimensional. Contudo, o algoritmo que permite, com precisão absoluta, determinar a estrutura tridimensional de uma proteína partindo-se de sua sequência, ainda está por ser determinado. A modelagem molecular comparativa tem o potencial de gerar modelos confiáveis. A condição necessária refere-se à existência de semelhanças entre a sequência designada e as outras do modelo e que o alinhamento correto entre elas possa ser construído. Esta aproximação para a modelagem da estrutura é possível porque uma pequena mudança na sequência de uma proteína normalmente resulta em pequenas mudanças em sua estrutura tridimensional (LESK et al., 2001).

Todas as aproximações baseadas nas restrições para modelagem molecular comparativa de proteínas extraem as distâncias e as restrições dos ângulos diedros a partir do alinhamento da sequência alvo com as estruturas relacionadas, adicionando restrições implícitas pela topologia covalente (restrições estereoquímicas) e calculam o modelo pela minimização das violações de todas as restrições. Desta forma, as duas principais diferenças entre as várias aproximações encontram-se na derivação e satisfação das restrições espaciais (ASTAKHOV, 2009). A precisão do método está em assumir a existência de semelhança detectável entre duas sequências lineares que proporcionem semelhanças estruturais. Após assumir a similaridade estrutural, a função potencial guiará o modelo no caminho dos *templates* em direção à estrutura correta (SÁNCHEZ E SALI, 1997).

5.12.1. Procura e seleção de modelos estruturais (*templates*)

Inicialmente foi necessária a procura de *templates* em um banco de dados de estruturas de proteínas (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>), usando-se como parâmetro de entrada uma sequência primária de estrutura determinada ou não experimentalmente (alvo) para que esta fosse alinhada com possíveis sequências homólogas de estruturas conhecidas depositadas no PDB (*templates*). Os modelos que possuíram similaridade mais elevada foram selecionados, isto é, porcentagem mais alta de resíduos idênticos e um menor número de *gaps* no alinhamento. O modelo de alta resolução foi preferencialmente usado, nesse caso para a HA o *template* utilizado foi a 2WR0 e para a PB2 foram utilizados dois *templates* o 2VQZ e 3KHW.

5.12.2. Alinhamento do modelo estrutural (*templates*)/alvo

Uma vez selecionado o *template*, um método deve ser utilizado para executar o alinhamento *template*/alvo. O alinhamento é um dos principais passos na modelagem, pois é dele que são extraídas as restrições espaciais para a construção do modelo. Para isso foi utilizado o programa MODELLER 9.10 (SALI E BLUNDELL, 1993), o qual é baseado no algoritmo de programação dinâmica, proposto por Needleman e Wunsch para alinhamento global (NEEDLEMAN E WUNSCH, 1970).

5.12.3. Construção do modelo

Uma vez realizado o alinhamento entre a sequência do alvo e do *template*, o modelo foi construído utilizando-se a modelagem molecular comparativa por satisfação das restrições espaciais implementadas no programa MODELLER e usa distância geométrica e técnica de otimização para satisfazer as restrições espaciais obtidas do alinhamento.

O programa MODELLER deriva muitas distâncias e restrições de ângulos diedros no alinhamento da sequência alvo com o modelo da estrutura 3D. As restrições espaciais na sequência alvo são obtidas da análise estatística das relações entre várias características da estrutura da proteína. Finalmente, o modelo foi escolhido pela otimização da função objetivo no espaço cartesiano e o modelo escolhido teve a menor energia, assim garantindo sua maior integridade.

5.12.4. Avaliação dos modelos

A qualidade do modelo predito determina a informação que pode ser extraída dele. Assim, estimar a precisão do modelo 3D da proteína é essencial para interpretá-lo. O modelo foi avaliado como um todo, bem como em regiões individuais, com base na similaridade entre as sequências do *template* e do alvo, observando a presença de resíduos importantes em regiões da proteína, tais como o sítio ativo e sua conservação (SÁNCHEZ E SALI, 1998). O programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1998) foi utilizado para a validação do valor estereoquímico, além dos programas VERIFY3D (LUTHY et al., 1992) e ANOLEA (MELO E FEYTMANS, 1998) que foram empregados para a avaliação de outras variantes como o comprimento de ligação, ângulo de ligação, ligação peptídica e planaridade de anéis da cadeia lateral, quiralidade, ângulos de torção da cadeia principal e cadeia lateral e choques entre pares de átomos não ligados. Finalmente o modelo foi visualizado através do programa Pymol v.1.5 (<http://pymol.org/>).

5.13. AVALIAÇÃO ÉTICA DA PESQUISA

Este projeto foi elaborado obedecendo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. O presente estudo pertence a um projeto maior intitulado como “*PROJETO FLU A H1N1: Fatores genéticos, imunológicos e virológicos relacionados à gravidade da gripe causada pelo vírus A H1N1 pandêmico*” que obteve o parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical/UFGA com o protocolo nº 016/2010 (anexo A). Este estudo foi desempenhado com amostras pertencentes ao IEC. Desse modo esta pesquisa foi submetida também ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IEC obtendo o parecer de aprovação nº 042/2011, protocolo CEP/IEC – nº 022/2011, CAAE: 0021.0.072.000-11 (anexo B).

6. RESULTADOS

Foram isolados em cultura de células MDCK 87 cepas do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm, entre elas quatro casos de óbito. Destas, foi realizado o sequenciamento completo de 81 amostras para os genes codificadores da HA (1778 nucleotídeos / 550 aminoácidos) e 82 amostras para PB2 (2341 nucleotídeos / 759 aminoácidos), pois cinco e seis amostras para H1 e PB2, respectivamente, não amplificaram, não foram sequenciadas e, foram excluídas. A discriminação dessas amostras de acordo com os genes e variáveis estão ilustradas na tabela 2.

Variáveis	HA n=82	PB2 n=81
Sexo		
Homens	47,68% (n=35)	3,21% (n=35)
Mulheres	57,32% (n=47)	56,79% (n=46)
Idade		
<1	3,66% (n=3)	3,71% (n=3)
1-15	47,56% (n=39)	46,91% (n=38)
16-30	31,71% (n=26)	30,86% (n=25)
31-45	8,53% (n=7)	9,88% (n=8)
46-60	4,88% (n=4)	4,94% (n=4)
61-75	2,44% (n=2)	2,47% (n=2)
>76	1,22% (n=1)	1,23% (n=1)
Onda		
1ª Onda	47,56% (n=39)	46,91% (n=38)
2ª Onda	52,44% (n=43)	53,09% (n=43)
Hospitalização		
Sim	51,22% (n=42)	48,15% (n=39)
Não	48,78% (n=40)	51,85% (n=42)
Óbitos	4,88% (n=4)	4,94% (n=4)

TABELA 2. Discriminação das amostras quanto ao sexo, idade, período e hospitalização para a proteína HA e PB2 do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm circulante na mesorregião de Belém durante a pandemia de 2009/2010.

6.1. HEMAGLUTININA (HA)

O total de 82 sequências completas do gene codificador da HA foram analisadas, onde na edição e alinhamento das sequências nucleotídicas utilizou-se a cepa vacinal, A/California/07/2009 (H1N1), como cepa de referência para o alinhamento, as quais demonstraram 93% de identidade (sítios conservados entre elas), porém quando analisadas par-a-par essa identidade chega a 99,7%.

Dentre essas 82 sequências da HA, foram identificadas algumas substituições aminoacídicas que estão descritas na tabela 3 e quadro 10.

TABELA 3. Substituições aminoacídicas na proteína HA do vírus *Influenza A (H1N1) pdm* circulante na mesorregião de Belém durante a pandemia de 2009/2010.

Substituição*	Posição					
	83	97	203	222	293	321
	P→S	D→N	S→T	D→G	Q→H	I→V
Frequência	100% (n=82)	28% (n=23)	61% (n=50)	2,4% (n=2)	38% (n=31)	100% (n=82)

* P: Prolina; S: Serina; D: Ácido Aspártico; N: Asparagina; T: Treonina; G: Glicina; Q: Glutamina; H: Histidina; I: Isoleucina; V: Valina.

Todas essas substituições também foram confrontadas com algumas cepas de referência de 2012, observando-se que as mudanças nas posições 83 e 321 aparentemente se fixaram durante esses dois anos e as demais estão ocorrendo frequentemente, como está ilustrado no quadro 10.

Cepas do Vírus H1N1 pandêmico		Substituições Aminoácídicas					
		83	97	203	222	293	321
Cepa Vacinal	Influenza A virus (A/California/07/2009(H1N1))	P	D	S	D	Q	I
Cepas de Referência de 2012	Influenza A virus (A/Mexico City/INER1149/2012(H1N1))	S	D	T	D	Q	V
	Influenza A virus (A/Mexico City/INER1078/2012(H1N1))	S	D	T	D	Q	V
	Influenza A virus (A/Washington/2962/2012(H1N1))	S	D	T	D	Q	V
	Influenza A virus (A/Texas/2956/2012(H1N1))	S	D	T	D	Q	V
	Influenza A virus (A/California/2967/2012(H1N1))	S	D	T	D	Q	V
	Influenza A virus (A/Florida/AF2877/2012(H1N1))	S	D	T	D	Q	V
Cepas Analisadas 1º Onda (2009)	Influenza A/Ananindeua/106611/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/106575/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Santa Bárbara/106547/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Santa Bárbara/106546/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/106508/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Ananindeua/106468/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Ananindeua/106426/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/106414/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Marituba/106399/2009(H1N1)	S	N			H	V
	Influenza A/Belém/106395/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/106386/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Ananindeua/106375/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/106308/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/106275/2009(H1N1)	S		T			V
	Influenza A/Belém/106255/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/106254/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/106224/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/106139/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/106218/2009(H1N1)†	S		T	G		V
	Influenza A/Belém/106117/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Barcarena/106116/2009(H1N1)	S					V
	Influenza A/Belém/106090/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/106080/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/106056/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/105836/2009(H1N1)	S	N				V
	Influenza A/Belém/105715/2009(H1N1)	S		T			V
	Influenza A/Marituba/105647/2009(H1N1)	S		T			V
	Influenza A/Belém/105615/2009(H1N1)	S		T			V
	Influenza A/Belém/105416/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/105399/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/105398/2009(H1N1)	S		T		H	V
	Influenza A/Belém/105326/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/105243/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/105140/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/105060/2009(H1N1)	S		T			V
	Influenza A/Belém/104995/2009(H1N1)	S	N	T			V
	Influenza A/Belém/104994/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Belém/104552/2009(H1N1)	S				H	V
	Influenza A/Ananindeua/104531/2009(H1N1)	S				H	V
	Cepas Analisadas 2º Onda (2010)	Influenza A/Ananindeua/108463/2010(H1N1)	S		T		
Influenza A/Belém/108457/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Ananindeua/108422/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/108421/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Marituba/108420/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/108416/2010(H1N1)		S		T		H	V
Influenza A/Marituba/108402/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Ananindeua/110146/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/110100/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/109989/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109891/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109883/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Ananindeua/109864/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109685/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109664/2010(H1N1)		S	N	T			V
Influenza A/Castanha/109631/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/109623/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Ananindeua/109628/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109613/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109515/2010(H1N1)		S	N	T			V
Influenza A/Ananindeua/109513/2010(H1N1)		S	N	T			V
Influenza A/Belém/109465/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Ananindeua/109371/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/109365/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Ananindeua/109317/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109316/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/109279/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109133/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/109051/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Ananindeua/108886/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/108871/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Ananindeua/108826/2010(H1N1)		S	N	T			V
Influenza A/Belém/108646/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Ananindeua/108518/2010(H1N1)†		S		T			V
Influenza A/Belém/108509/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/108481/2010(H1N1)		S	N	T			V
Influenza A/Belém/108395/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/108275/2010(H1N1)		S				H	V
Influenza A/Belém/108263/2010(H1N1)		S		T			V
Influenza A/Belém/108218/2010(H1N1)†		S	N	T			V
Influenza A/Belém/108193/2010(H1N1)	S		T			V	
Influenza A/Belém/108267/2010(H1N1)†	S		T	G		V	
Influenza A/Belém/108095/2010(H1N1)	S		T			V	

QUADRO 10. Mudanças nos aminoácidos da HA no vírus H1N1pdm da Mesorregião de Belém, comparadas com a cepa vacinal e cepas de referência 2012. Em fundo cinza: cepa vacinal; em fundo verde: 1º onda; em fundo amarelo: 2º onda. As estripes com a cor vermelha são cepas isoladas de casos fatais (†).

Na modelagem molecular, os moldes gerados foram validados pelos programas PROCHECK E VERIFY3D gerando estruturas de boa qualidade estereoquímica. A figura 13 demonstra as substituições S203T (figura 13A) e D222G (figura 13B) que estão presentes no sítio antigênico da proteína HA, alterando a conformação do aminoácido na proteína.

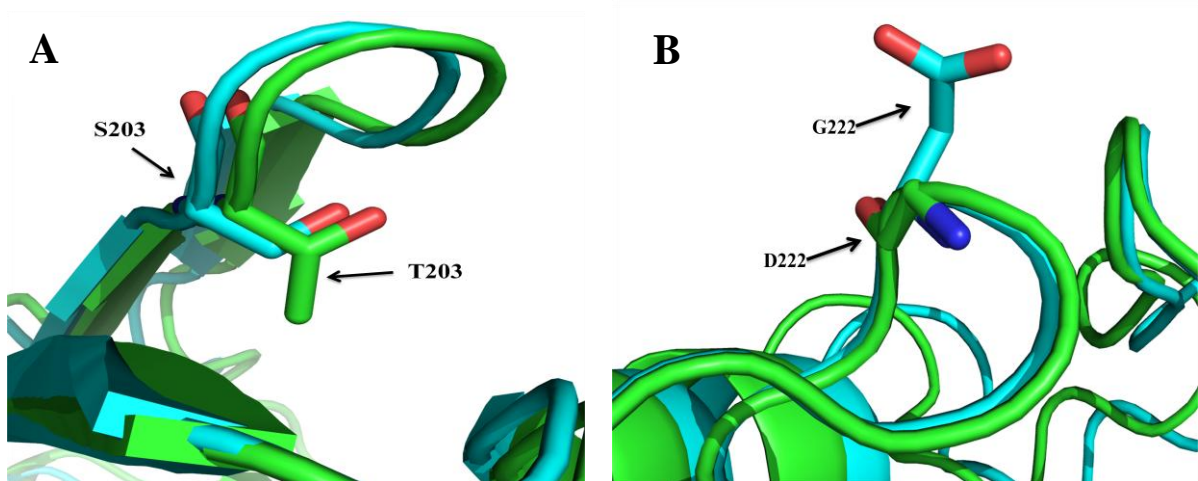


FIGURA 13. Estrutura cristalográfica tridimensional da proteína H1 do vírus H1N1 pdm. **A:** Resíduo S203 (azul/molde) e T203 (verde). **B:** Resíduo D222 (verde/molde) e G222 (azul). Identificados por setas.

A modelagem molecular da substituição Q293H por homologia demonstrou identidade no alinhamento entre a proteína alvo e a proteína molde. Tal substituição está presente na região da HA1 da HA, alterando a conformação da proteína (figura 14).

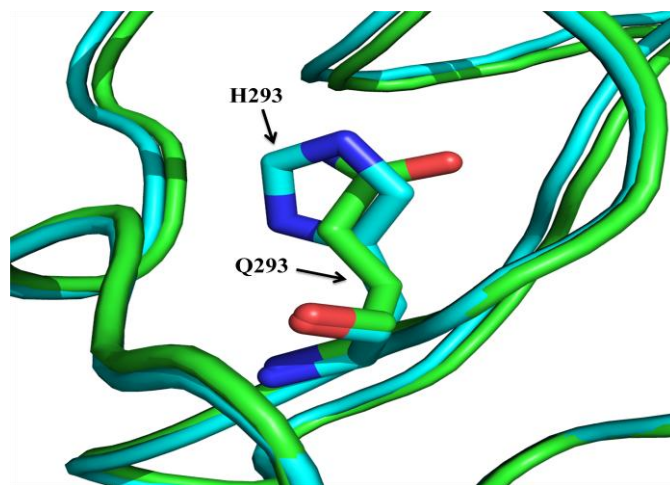


FIGURA 14. Estrutura cristalográfica tridimensional da proteína HA evidenciando os resíduos Q293 (verde/molde) e H293 (azul) do vírus (H1N1) pandêmico, encontram-se identificados por setas.

A figura 15 demonstra todas as substituições na proteína da HA descritas nesse trabalho. As substituições P83S, D97N, S203T e D222G estão presentes na extremidade globular da HA e as Q293H e I321V estão na haste da proteína.

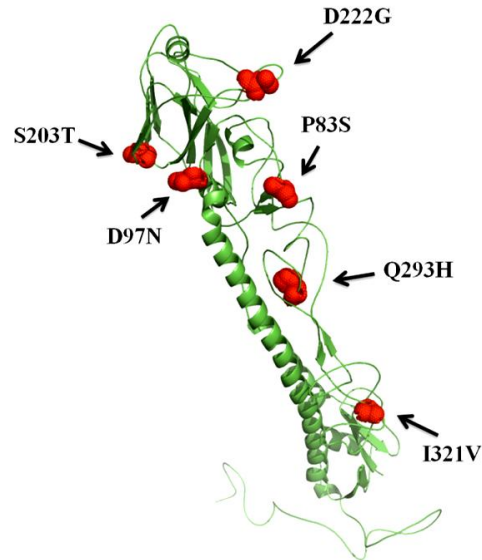


FIGURA 15. Estrutura tridimensional da molécula da HA demonstrando as suas principais modificações.

Segundo o período estudado, foram analisadas 39 amostras na 1ª onda (2009) e 43 na 2ª onda (2010). Observou-se que as substituições aminoacídicas foram recorrentes nas diferentes ondas não somente de forma única na amostra, mas também em concomitância com outras, como ilustrado na figura 16.

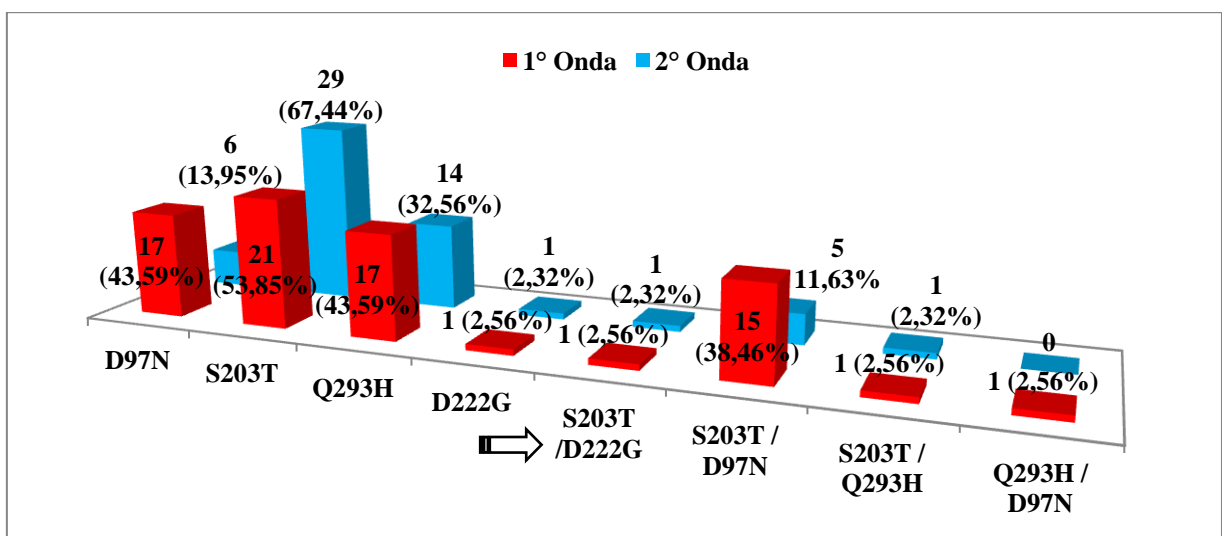


FIGURA 16. Substituições aminoacídicas na proteína HA do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm de acordo com as ondas.

Observa-se que a substituição D97N, sozinha ou associada com a S203T, circulou mais na primeira onda que na segunda. Com o objetivo de verificar se as substituições tiveram alguma relação com período da pandemia utilizou-se o teste estatístico de regressão logística simples no qual foram excluídas aleatoriamente quatro amostras da segunda onda para ambas terem o mesmo “n” amostral (n=39). O *p*-valor obtido nessa análise foi significativo (0,0041 e 0,0128, respectivamente) demonstrando que a substituição D97N está realmente mais associada a cepas circulantes na primeira onda que na segunda. As demais substituições circularam de maneira uniforme ao longo de todo o período pandêmico (*p*-valor > 0,05) (tabela 4).

TABELA 4. Distribuição das substituições aminoacídicas na H1 de acordo com as ondas pandêmicas (2009 e 2010).

Hemaglutinina			
Substituição Aminoacídica	1° Onda	2° Onda	<i>P</i>-valor
D97N	17	05	0,0041
S203T	21	27	0,1648
D222G	01	01	1,0000
Q293H	17	12	0,2432
Co-circulação de Substituições	1° Onda	2° Onda	<i>P</i>-valor
S203T / D97N	15	05	0,0128
S203T / D222G	01	01	1,0000
Q293H / D97N	01	0	0,9455
Q293H / S203T	01	01	1,0000

Quanto à hospitalização, durante a pandemia somente eram internados os pacientes com SRAG considerados - a critério médico - mais graves. Nenhuma das substituições isoladas ou associadas demonstrou ter relação à hospitalização (*p*-valor > 0,05) (tabela 5).

TABELA 5. Distribuição das substituições aminoacídicas na H1 de acordo com a hospitalização.

Hemaglutinina			
Substituição Aminoacídica	Hospitalizado	Não Hospitalizado	<i>P</i>-valor
D97N	11	12	0,7013
S203T	24	26	0,4666
D222G	02	0	0,9232
Q293H	20	11	0,0629
Co-circulação de Substituições	Hospitalizado	Não Hospitalizado	<i>P</i>-valor
S203T / D97N	10	11	0,7021
S203T / D222G	02	0	0,9232
Q293H / D97N	01	0	0,9457
Q293H / S203T	02	0	0,9232

Ao que se refere às variáveis sexo e idade nenhuma dos tipos de substituição aminoacídica na H1 demonstrou relação (tabela 6).

Tabela 6. Substituições aminoacídicas na H1 de acordo com a idade e sexo.

Variáveis	Hemaglutinina							
	Substituição Aminoacídica				Co-circulação de Substituições			
	<i>P-valor</i>				<i>P-valor</i>			
	D97N	S203T	D222G	Q293H	S203T /D97N	S203T /D222G	Q293H /D97N	Q293H /S203T
<i>Idade</i>	0,6292	0,7144	0,8755	0,7041	0,9302	0,8755	0,9955	0,2127
<i>Sexo</i>	0,9276	0,8758	0,9249	0,2044	0,2203	0,8938	0,9250	0,9032

6.2. POLIMERASE BÁSICA 2 (PB2)

Para o estudo da proteína PB2, foram analisadas 81 sequências completas do gene, na edição e alinhamento das sequências nucleotídicas utilizou-se a cepa vacinal, A/California/07/2009 (H1N1), demonstrando 94.4% de identidade, porém quando analisadas par-a-par essa identidade chega a 99,6%.

Entre as 81 sequências três substituições aminoacídicas foram observadas: K340N (12%, n=10); K526R (27%, n=22) e M631L (32%, n=26) (tabela 7).

TABELA 7. Substituições aminoacídicas na proteína PB2 do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm circulante na mesorregião de Belém durante a pandemia de 2009/2010.

Substituição*	Posição		
	340	526	631
	K→N	K→R	M→L
Frequência	12% (n=10)	27% (n=22)	32% (n=26)

* K: Lisina; N: Asparagina; R: Arginina; M: Metionina; L: Leucina.

Quando as substituições observadas na PB2 são comparadas com a sequência de uma cepa de origem aviária nota-se que, apesar do gene da PB2 do vírus H1N1 pdm ser de origem aviária, ele não contém “assinatura” aviária, ou seja, um conjunto de aminoácidos característicos que são conservados dentro da espécie. E quando comparadas com a cepa vacinal (2009) e com cepas de referência de 2012, observa-se que as mudanças nas posições 340, 526 e 631 não se fixaram (quadro 11).

PB2										
Cepas do Vírus H1N1 pandêmico		Assinatura Aminoacídica					Substituições Aminoacídicas			
		271	590	591	627	701	340	526	631	
Cepa Aviária	Vírus Influenza A de origem Aviária	T	G	Q	K	N				
Cepa Vacinal	Influenza A vírus (A/California/07/2009(H1N1))	A	S	R	E	D	K	K	M	
Cepas de Referência 2012	Influenza A vírus (A/Vladivostok/28/2012(H1N1))	A	S	R	E	D	K	K	M	
	Influenza A vírus (A/Tomsk/IV-19/2012(H1N1))	A	S	R	E	D	K	K	M	
	Influenza A vírus (A/Moscow/IV-45/2012(H1N1))	A	S	R	E	D	K	K	M	
Cepas Analisadas 1º Onda (2009)	Influenza A/Ananindeua/106611/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/106575/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Santa Bárbara/106547/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Santa Bárbara/106546/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/106508/2009(H1N1)	A	S	R	E	D		R		
	Influenza A/Ananindeua/106468/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/106461/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/106414/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Marituba/106399/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106395/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/106386/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106308/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/106275/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106255/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106254/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106224/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Ananindeua/106336/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106139/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106218/2009(H1N1)†	A	S	R	E	D			R	L
	Influenza A/Belém/106117/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Barcarena/106116/2009(H1N1)	A	S	R	E	D	N			
	Influenza A/Belém/106080/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/106056/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/105715/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Marituba/105647/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/105615/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/105416/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/105399/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/105398/2009(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/105326/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
Influenza A/Belém/105243/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R		
Influenza A/Belém/105200/2009(H1N1)	A	S	R	E	D					
Influenza A/Belém/105140/2009(H1N1)	A	S	R	E	D					
Influenza A/Belém/105060/2009(H1N1)	A	S	R	E	D					
Influenza A/Belém/104995/2009(H1N1)	A	S	R	E	D					
Influenza A/Belém/104994/2009(H1N1)	A	S	R	E	D			R		
Influenza A/Belém/104552/2009(H1N1)	A	S	R	E	D		N			
Influenza A/Ananindeua/104531/2009(H1N1)	A	S	R	E	D		N			
Cepas Analisadas 2º Onda (2010)	Influenza A/Ananindeua/108463/2010(H1N1)	A	S	R	E	D			L	
	Influenza A/Belém/108457/2010(H1N1)	A	S	R	E	D	N			
	Influenza A/Ananindeua/108422/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/108421/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Marituba/108420/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/108416/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Marituba/108402/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Ananindeua/110146/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/110100/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Ananindeua/110101/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/109989/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/108981/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109883/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Ananindeua/109864/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109685/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109664/2010(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Castanhal/109603/2010(H1N1)	A	S	R	E	D		N		
	Influenza A/Castanhal/109631/2010(H1N1)	A	S	R	E	D		N		
	Influenza A/Ananindeua/109628/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109613/2010(H1N1)	A	S	R	E	D		N		L
	Influenza A/Belém/109515/2010(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Ananindeua/109513/2010(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/109465/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109365/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Ananindeua/109317/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109316/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				
	Influenza A/Belém/109279/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109133/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/109051/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Ananindeua/108886/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/108871/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Ananindeua/108826/2010(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
	Influenza A/Belém/108646/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Ananindeua/108518/2010(H1N1)†	A	S	R	E	D		N		L
	Influenza A/Belém/108509/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L
	Influenza A/Belém/108481/2010(H1N1)	A	S	R	E	D			R	
Influenza A/Belém/108395/2010(H1N1)	A	S	R	E	D					
Influenza A/Belém/108275/2010(H1N1)	A	S	R	E	D		N			
Influenza A/Belém/108263/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L	
Influenza A/Belém/108218/2010(H1N1)†	A	S	R	E	D					
Influenza A/Belém/108193/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L	
Influenza A/Belém/108267/2010(H1N1)†	A	S	R	E	D		N		L	
Influenza A/Belém/108095/2010(H1N1)	A	S	R	E	D				L	

QUADRO 11. Mudanças nos aminoácidos da PB2 no vírus H1N1pdm na Mesorregião Metropolitana de Belém, comparadas aos resíduos das cepas de referência 2012 e cepa vacinal. Em fundo cinza: cepa vacinal; em fundo verde: 1º onda; em amarelo: 2º onda e as estirpes com a cor vermelha são cepas isoladas de casos fatais(†).

A modelagem molecular, com moldes validados pelos programas PROCHECK E VERIFY3D, demonstra que a substituição K340N altera a conformação proteica (figura 17).

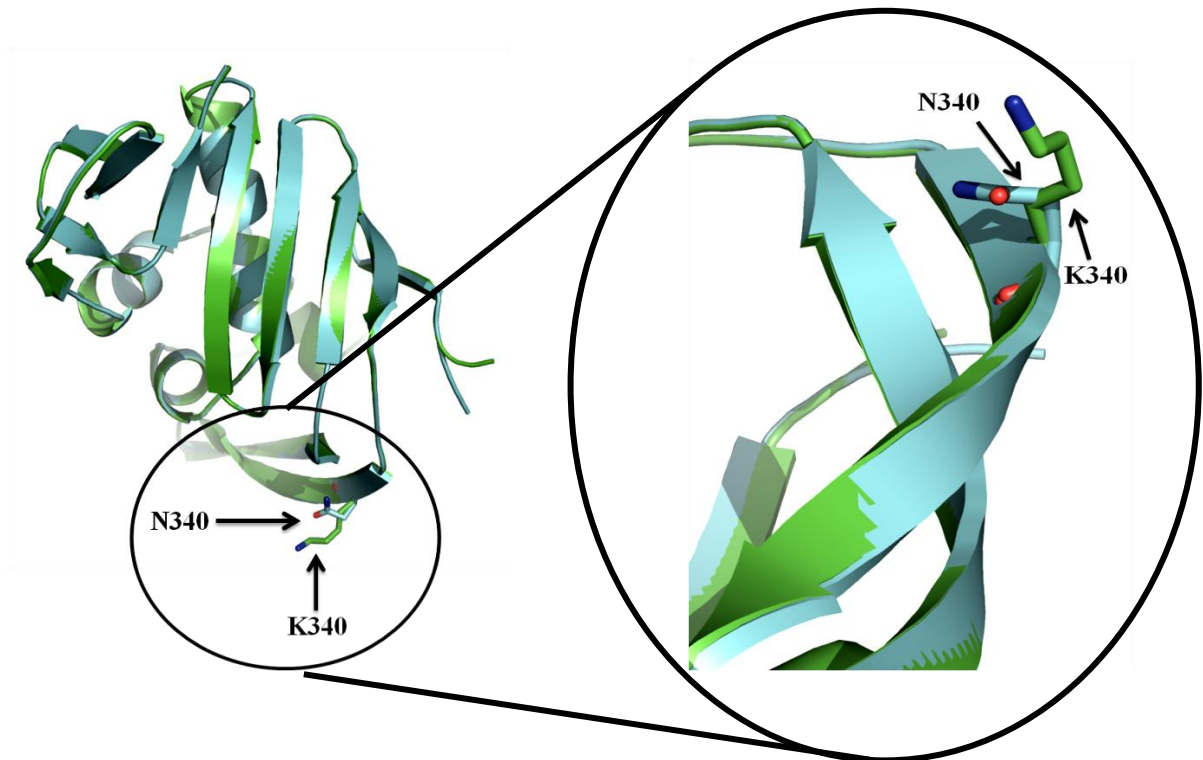


FIGURA 17. Estrutura cristalográfica da proteína PB2 (painel da esquerda). A alteração conformacional do resíduo K340 (verde/molde) para N340(azul) do vírus (H1N1) pandêmico, em detalhe (painel da direita). As setas indicam a substituição de aminoácidos.

A modelagem molecular da substituição M631L foi representada por homologia em modelo tridimensional evidenciando a alteração de conformação na proteína molde. (figura 18).

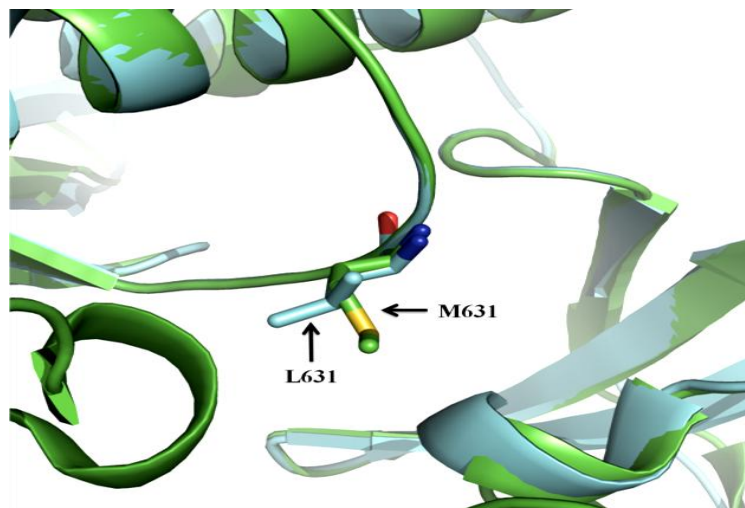


FIGURA 18. Estrutura cristalográfica da proteína PB2 ilustrando os resíduos M631(verde/molde) e L631(azul), indicados por setas, do vírus (H1N1) pandêmico.

Para a substituição K526R, não foi possível representá-la em modelo tridimensional devido à inexistência de sequências homólogas a região alvo (*template*) que possuam estrutura modelo cristalografado disponível no banco de dados de estruturas de proteínas (PDB).

As substituições aminoacídicas na PB2 foram avaliadas de acordo com o período estudado, no qual 38 amostras eram da 1ª onda (2009) e 43 da 2ª onda (2010). A substituição K526R foi mais evidenciada em cepas que circularam na primeira onda (42%, n=38) enquanto que a M631L foi mais frequente na segunda (51%, n=43) (figura 19).

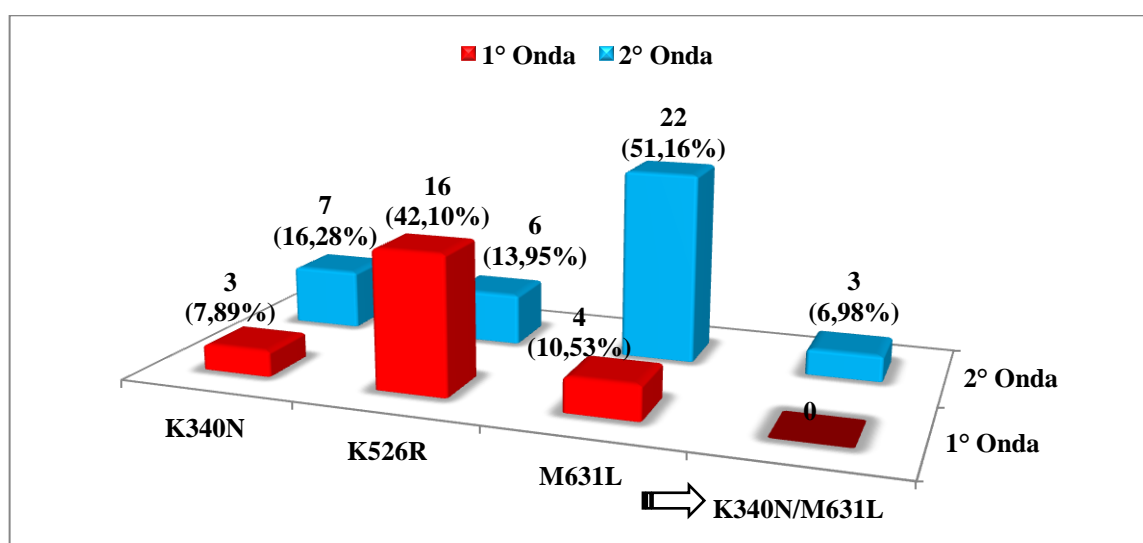


FIGURA 19. Substituições aminoacídicas na proteína PB2 do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm de acordo com as ondas.

Com a finalidade de verificar se as substituições tiveram alguma relação com período, utilizou-se o teste estatístico de regressão logística simples no qual foram excluídas aleatoriamente cinco amostras da segunda onda (n=43) para ambas terem o mesmo “n” amostral (n=38). Portanto, o *p*-valor obtido para a K526R foi significativo, igual a 0,0070, demonstrando que essa substituição está realmente mais identificada na primeira onda que na segunda, enquanto que, a M631L está mais associada a segunda do que a primeira (*p*-valor significativo igual a 0,0003)(tabela 8).

TABELA 8. Distribuição das substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com a onda.

PB2			
Substituição Aminoacídica	1ª Onda	2ª Onda	<i>P</i>-valor
K340N	03	07	0,1862
K526R	16	05	0,0070
M631L	04	20	0,0003
K340N / M631L	0	3	0,9053

Quando se considerou o critério hospitalização, nenhuma das substituições em PB2, isoladas ou associadas, demonstrou ter relação à hospitalização (p -valor > 0,05) (tabela 9).

TABELA 9. Distribuição das substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com a hospitalização.

PB2			
Substituição Aminoacídica	Hospitalizado	Não Hospitalizado	<i>P</i>-valor
K340N	07	03	0,2303
M631L	10	16	0,1004
K526R	10	12	0,4826
K340N / M631L	2	1	0,6063

Ao que se refere às variáveis sexo e idade, nenhum dos tipos de substituições demonstrou ter qualquer relação, (p -valor > 0,05) (tabela 10).

TABELA 10. Substituições aminoacídicas na PB2 de acordo com a idade e sexo.

PB2				
Variáveis	Substituição Aminoacídica			
	<i>P</i>-valor			
	K340N	M631L	K526R	K340N / M631L
Idade	0,3201	0,1043	0,2046	0,2453
Sexo	0,1315	0,0457	0,4523	0,9077

6.3. ÓBITOS

Dos 739 casos de gripe por H1N1 pdm procedentes da mesorregião metropolitana de Belém, em 2009 e 2010, 29 amostras foram notificadas e confirmadas laboratorialmente como casos de óbitos. Entretanto, somente quatro cepas foram isoladas e amplificadas. O resumo desses casos bem como a presença ou não das substituições aminoacídicas encontradas na HA e PB2 está descrito no quadro 12.

Variáveis	Óbitos			
	Caso 01	Caso 02	Caso 03	Caso 04
Onda	1ª onda	2ª Onda	2ª Onda	2ª Onda
Hospitalização	+	+	+	+
Sexo	F	F	F	F
Idade	22	20	52	4
Comorbidade	+ ¹	-	+ ^{1,2}	-
Gravidez	+	+	-	-
Padrão Radiológico de tórax alterado	-	-	+ ^a	+ ^b
Substituição Aminoacídica				
HA				
D97N	-	-	+	-
S203T	+	+	+	+
D222G	+	+	-	-
Q293H	-	-	-	-
PB2				
K340N	-	+	-	+
K526R	-	-	+	-
M631L	+	+	-	+

QUADRO 12. Identificação e caracterização do perfil de cada óbito.

1 – Pneumopatia; 2 – Cardiopatia.

a – Consolidação; b – Infiltrado Intertiscial.

A figura 20 ilustra a frequência de cada mudança aminoacídica entre os quatro casos de óbitos. Analisando as mudanças aminoacídicas, pode-se observar que todos os casos apresentaram as substituições descritas no presente trabalho (exceto a Q293H), no entanto devido ao pequeno número de casos não se pode inferir sobre a sua associação.

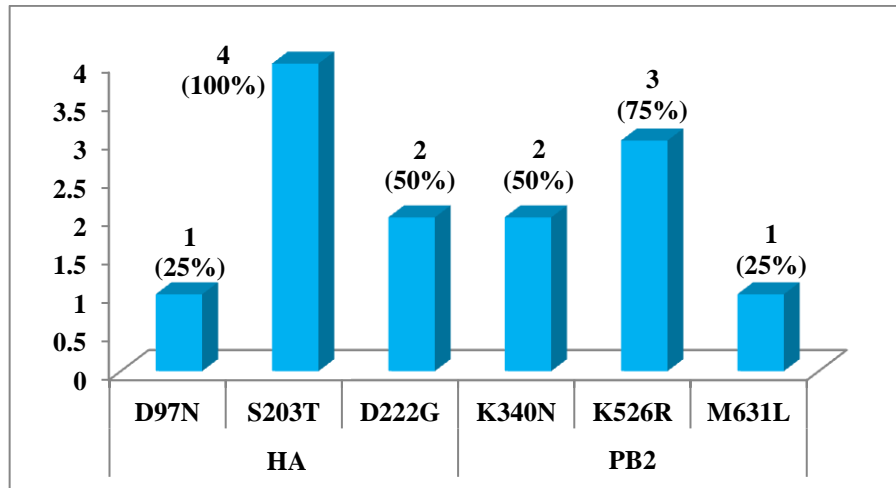


FIGURA 20. Distribuição dos óbitos em relação à substituição.

7. DISCUSSÃO

As substituições aminoacídicas resultantes de mutações nucleotídicas em localizações chaves nas proteínas, tais como nos sítios antigênicos ou no sítio de ligação da HA ao receptor ou ainda no sítio ativo da polimerase viral da PB2 podem alterar as propriedades associadas com a antigenicidade ou patogenicidade do vírus.

No que concerne o gene da hemaglutinina foi possível identificar a substituição de um ácido aspártico (aminoácido polar ácido carregado negativamente) por uma glicina (aminoácido apolar neutro eletricamente neutro) na posição 222 (D222G), a qual tem sido associada a casos graves e fatais de infecção pelo vírus *Influenza A H1N1 pdm* (KILANDER et al., 2010; LIU et al., 2010; MAK et al., 2010; MILLER et al., 2010; PUZELLI et al., 2010; XU et al., 2010).

A ligação do vírus a célula hospedeira é mediada pela interação do domínio de ligação ao receptor (*RBD - receptor binding domain*) da HA ao receptor da superfície celular contendo ácido siálico. A sequência RBD é, portanto, um dos principais determinantes de especificidade do hospedeiro (PAN et al., 2010), como o resíduo 222 faz parte do RBD da H1, a substituição D222G pode afetar diretamente a infectividade e transmissibilidade do vírus H1N1pdm em seres humanos, tal como foi demonstrado por Liu e colaboradores (2010), as cepas com a variante D222G possuíam mais afinidade ao receptor SA α 2,3Gal, principalmente expressos em células ciliadas do epitélio traqueobrônquico e sobre as células dos bronquíolos e alvéolos no trato respiratório inferior, sugerindo que a identificação mais frequente de variantes D222G em amostras do trato respiratório inferior contribui para a gravidade da infecção pulmonar, e pode explicar por que eles são dificilmente transmitidos (LIU et al., 2010).

Conforme Kilander e colaboradores (2010) mostraram que dentre 61 dos casos graves e fatais, 11 apresentavam a substituição D222G, sendo esta ausente nos casos moderados. Miller e colaboradores (2010) e Mak e colaboradores (2010) também fizeram associação da D222G com casos fatais. No estudo de Puzelli e colaboradores (2010), entretanto, foram detectadas quatro cepas contendo D222G de um total de 169 casos analisados, sendo três (3/52) provenientes de casos graves e fatais e uma (1/117) de caso moderado. Na análise referente ao presente estudo, das quatro amostras oriundas de casos que

evoluíram ao óbito, duas (2,4%) continha a substituição D222G e, interessante, acompanhada da simples substituição S203T. Vale ressaltar que a D222G não foi observada em nenhum caso não fatal.

A substituição da Serina (aminoácido apolar neutro) por treonina (aminoácido apolar neutro) na posição 203 (S203T) está localizada dentro do sítio antigênico Ca1, desse modo, podendo contribuir para a variação antigênica tal como descrito por Kao e colaboradores (2012) onde em 97,13% (169/174) dos isolados de 2009 continham essa substituição. Em outro estudo, foi observada que a substituição S203T teve um gradual aumento de 44% (8/18) a partir de abril de 2009, predominando em 100% (13/13) dos vírus a partir de agosto do mesmo ano, essa mudança foi observada em todos os vírus que circularam no Reino Unido (e em outros lugares) de Julho em diante, e tem se destacado como uma das cinco substituições em todo o genoma de H1N1 (2009) que estão concomitantemente presentes em todos os vírus H1N1pdm recentes, caracterizando uma nova variante genética que substituiu os vírus circulantes originalmente em abril de 2009 (GALIANO, 2011).

No presente estudo foi evidenciada a ocorrência desta substituição em 61% (50/82) das cepas. A mesma também foi observada, em concomitância, com três outras substituições: Q293H em 2,4% (2/82) das cepas; D97N em 26% das amostras (21/82) e a D222G em 2,4% dos casos. Ressalta-se, que os quatro casos de óbitos descritos neste trabalho apresentaram a S203T.

Além das substituições acima descritas, também foi identificada a substituição da glutamina (aminoácido apolar neutro) por uma histidina (aminoácido polar básico) na posição 293 (Q293H) - que está na porção HA1 da HA - em 38% (31/82) das amostras. Tanto no estudo de Galiano e colaboradores (2011), quanto no de Kao e colaboradores (2012), essa substituição não foi associada a pacientes com complicações graves. Neste trabalho, a Q293H também não foi encontrada nos casos de óbitos.

Outras substituições na HA foram identificadas neste estudo, tais como a D97N presente em 28% das cepas (23/82), a P83S e I321V as quais foram identificadas em todas as cepas. Apesar de não ter sido possível determinar o papel dessas substituições na patogênese viral, a retenção dos resíduos alterados ao longo do tempo sugere uma evolução viral.

De acordo com os resultados da modelagem molecular foi observado que as substituições S203T, D222G e Q293H alteraram a conformação dos aminoácidos na proteína

sendo que as duas primeiras estão presentes no sítio antigênico Ca da hemaglutinina e a última está presente na região da HA1. A superfície da proteína HA do vírus *Influenza* é uma das maiores moléculas alvo para resposta de anticorpos do hospedeiro, portanto, mudanças nos aminoácidos nos sítios antigênicos ou na superfície da molécula podem ter um importante efeito quanto ao escape dos anticorpos específicos neutralizantes (PALESE E SHAW, 2007).

Segundo o período estudado, as substituições aminoácidas foram recorrentes nas diferentes ondas (2009 e 2010) não somente de forma única na amostra, mas também em concomitância com outras. Foi observado que cepas com a substituição D97N, isolada (p -valor: 0,0041) ou associada com a S203T (p -valor: 0,0128), circularam mais na primeira onda que na segunda demonstrando que essa substituição está mais associada à primeira onda que a segunda. Enquanto que, as demais substituições circularam de maneira uniforme em ambas as ondas apresentando p -valor $> 0,05$.

Quanto à gravidade, não foi possível dividir em casos leves, moderados e graves de acordo com os critérios da OMS, devido à escassez de informações nas fichas de notificação sobre os sinais e sintomas dos pacientes. Por outro lado, o tamanho amostral ($n=4$) de óbitos analisados, não foi expressivo estatisticamente, sendo difícil qualquer tipo de associação.

Ao contrário do tamanho amostral dos pacientes que apresentaram a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), que foi mais expressivo, no entanto, para analisar a variável gravidade entende-se que seria necessário ter outro grupo, o de “não SRAG”, com a finalidade de se comparar e verificar em qual grupo (SRAG e “não SRAG”) as substituições seriam mais pertinentes, pois, caso elas fossem mais identificadas no grupo SRAG possivelmente as mesmas poderiam estar associadas a gravidade da doença.

Contudo isso não foi possível, pois durante a pandemia – devido o volumoso número de amostras – somente foram coletadas e testadas as amostras dos pacientes que apresentaram os sintomas definidores de SRAG. Portanto, a melhor maneira que se encontrou de analisar a gravidade foi a variável hospitalização, pois somente eram internados os pacientes considerados – a critério médico – mais graves. Mas nenhuma das substituições, isoladas ou associadas, demonstrou ter relação à hospitalização.

Se reportando agora ao gene codificador da polimerase PB2, algumas alterações aminoacídicas também foram encontradas nas cepas do presente estudo, quando comparadas a cepa vacinal (A/California/07/2009) recomendada pela OMS.

As alterações nesse gene sejam por recombinação ou por mutação, podem auxiliar no estabelecimento de infecções. A polimerase do vírus *Influenza* desempenha um papel chave no processo de replicação viral. Tal como já foi observado em pandemias do século passado, nos quais rearranjos genéticos com a aquisição da subunidade PB1 de origem aviária foram observados, na pandemia de 2009 o complexo da polimerase era composto por PB2 e PA de origem aviária, PB1 de origem humana e NP de suíno clássico (NEUMANN E KAWAOKA, 2009).

Curiosamente, a PB2 da pandemia de 2009 não contém uma “assinatura” aviária, ou seja, um conjunto de aminoácidos característicos, que são conservados dentro da espécie, a PB2 possui “assinaturas” de origem suína nos resíduos A271, S590, R591, E627 e D701. Essas assinaturas, no entanto, somente apareceram após o estabelecimento do triplo rearranjo do vírus suíno que emergiu em 1998-1999, o qual foi introduzido nos vírus suínos Norte Americanos, traduzindo como estratégia adaptativa viral para replicar de forma mais eficiente em células mamíferas (BUSSEY et al., 2010; MEHLE E DOUDNA, 2009; WEBBY et al., 2000; YAMADA et al., 2010; ZHOU et AL., 1999). Na presente pesquisa todas as amostras analisadas possuem essas assinaturas.

Nos estudos de Mehle e Doudna (2009) e Yamada et al. (2010) foi descrita outra assinatura do vírus H1N1pdm, a qual foi denominada de polimorfismo SR, caracterizada por um par de variantes de aminoácidos conservados, que são extremamente raros nos vírus humanos sazonais: serina na posição 590 (S590) e Arginina na posição 591 (R591) que foi vista somente em concomitância com o ácido glutâmico na posição 627 (E627), e ainda afirmam que esse polimorfismo é uma estratégia utilizada pela PB2 do vírus para aumentar a atividade da polimerase para melhor replicação em células humanas, uma vez que na remoção do polimorfismo SR reduziu-se a atividade da polimerase em cerca de 50%, sugerindo um potencial papel na adaptação específica ao hospedeiro. O Polimorfismo SR também foi verificado em todas as amostras do presente estudo.

Além dessas assinaturas, a OMS (2010) relatou uma substituição na PB2 de uma lisina (aminoácido polar básico carregado positivamente) por uma asparagina (aminoácido

apolar neutro) na posição 340 (K340N) que tem sido reportada em casos moderados e fatais. Nas análises da presente pesquisa a modificação K340N foi identificada em 12% (10/81) das amostras, duas delas isoladas de casos fatais.

Outras substituições na PB2 foram identificadas neste estudo: a substituição de uma metionina (aminoácido apolar) pela leucina (aminoácido apolar) na posição 631 (M631L) presente em 32% (26/81) das cepas, entre estas três casos de óbitos; e a substituição de uma lisina (aminoácido polar básico carregado positivamente) por uma arginina (aminoácido polar básico carregado positivamente) na posição 526 (R526K) presente em 27% (22/81) das amostras, sendo uma de caso fatal. A relevância dessas substituições ainda não foi estabelecida, em uma análise preliminar, a modelagem molecular das substituições M631L e K340N evidenciou a alteração de conformação na proteína molde, no entanto ainda são necessárias investigações adicionais para esclarecer tais mudanças.

As análises de acordo com o período da pandemia revelaram que, as mudanças aminoacídicas nesse gene foram evidenciadas nas diferentes ondas. Observou-se que a substituição K526R circulou mais na 1ª onda enquanto que a M631L circulou mais na segunda, e, conforme o *p*-valor obtido para a K526R (0,0070) e M631L (0,0003) se evidenciou que a K526R está realmente mais associada à primeira onda que a segunda, enquanto que, a M631L está mais associada a segunda. No que se referem as demais substituições, as mesmas circularam de maneira uniforme em ambas.

Assim como para a HA, a análise de substituição aminoacídica na PB2 quanto a gravidade foi de acordo com a hospitalização. Nesse caso, nenhuma das substituições sozinhas ou associadas demonstrou ter relação à hospitalização, pois todas apresentaram *p*-valor > 0,05. Entretanto, assim como para o gene da HA, ainda seria interessante e pertinente analisar mais casos de óbitos e de pacientes “não SRAG” para considerar a ocorrência de tais substituições.

No que diz respeito aos quatro casos de óbitos, somente o caso 4 não apresentava condições (comorbidade e/ou gravidez) que justificasse a gravidade. Apesar da cepa isolada desse caso não possuir a substituição D222G, o vírus causador tinha a K340N, que está associada a casos severos (OMS, 2010)

Os casos 1 e 2 eram mulheres grávidas, uma com comorbidade (pneumopata). Vale ressaltar que ambas foram infectadas com cepa que continha a D222G na HA e uma com

K340N associada. A presença de tais substituições podem ter contribuído para maior gravidade de ambos os casos.

De fato, não se pode afastar a possibilidade de que essas variações antigênicas virais sejam na hemaglutinina (a maior determinante de patogenicidade viral), ou na PB2 (indispensável componente do complexo de replicação), terem contribuído na gravidade dos casos fatais. Pois, outros fatores devem ser analisados; fatores de risco como gravidez e comorbidades como cardiopatia e pneumopatia assumem papel importante no curso grave da doença. Tem-se especulado que a hipertensão pulmonar secundária a doença cardiovascular ou o aumento do volume sanguíneo durante a gravidez podem predispor o pulmão a edema pulmonar quando o septo alveolar é agredido pelo vírus (KUIKEN E TAUBENBERGER, 2008). Levando isso, em consideração, foram excluídos do estudo todos os casos de SRAG (exceto os óbitos) que continham comorbidade relatada.

Por isso, vale ressaltar que todos os casos no presente estudo, continham a síndrome respiratória aguda grave sem nenhuma comorbidade associada (exceto os casos de óbitos) e as análises genéticas virais revelaram substituições aminoacídicas em sítios antigenicamente importantes da HA e/ou na PB2, desse modo, não se afasta a possibilidade – nesses casos de SRAG sem comorbidade – de que as variações antigênicas virais podem ter contribuído para a síndrome respiratória.

O presente estudo demonstrou que o vírus *Influenza A (H1N1) pdm 2009/2010* apresentou variadas alterações em casos de SRAG sem comorbidade e óbitos nos genes da HA e PB2. Entretanto, são necessárias mais investigações como modelos “*in vivo*” para avaliar a gravidade que essas substituições podem ocasionar. É importante ressaltar que, parece haver uma tendência de mutações em epítomos antigenicamente importantes da molécula da HA e estas mutações podem ter efeitos bastante drásticos no reconhecimento de anticorpos tanto entre os indivíduos vacinados quanto aqueles que experimentarem uma infecção natural. Logo, a contínua vigilância genética e antigênica do vírus da gripe em circulação bem como o compartilhamento rápido de informações é de extrema importância para a melhor recomendação possível para os vírus que entram na composição vacinal, evitando assim maior risco de epidemias severas futuras.

8. CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou que o vírus *Influenza A* (H1N1) pdm 2009/2010 apresentou variadas alterações nos genes da HA e PB2, em casos de óbitos e de SRAG sem comorbidade. Tais mutações resultaram na mudança conformacional da proteína.
- As mudanças aminoacídicas tanto no gene da HA como no da PB2 apresentaram uma relação com período. Na HA, a D97N isolada ou associada com a S203T, circulou mais na primeira onda que na segunda. Já na PB2 a substituição K526R foi mais associada à primeira onda que a segunda, enquanto que, a M631L foi mais associada a segunda.
- Nenhuma das substituições aminoacídicas seja na HA ou PB2 foram associadas a hospitalização, sexo e idade.
- As substituições D222G na HA e K340N na PB2 foram evidenciadas em casos fatais.
- A substituição S203T esteve presente nos quatro casos fatais.

9. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F., GISH, W. Local alignment statistics. **Methods in Enzymology**. n. 266, p.460-480, 1996.

AMOS. Disponível em : < <http://sourceforge.net/apps/mediawiki/amos/index.php>>. Acesso em: 27/06/11.

ASTAKHOV, V. Methods of information geometry in computational system biology (consistency between chemical and biological evolution). **Methods in Molecular Biology**. n.569. p.115-27, 2009.

BLAST Assembled RefSeq Genomes. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 27/06/11.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: MS, 2010. p. 1-21.

BUSSEY, K. A., BOUSSE, T. L., DESMET, E. A., KIM, B., TAKIMOTO, T. PB2 Residue 271 Plays a Key Role in Enhanced Polymerase Activity of *Influenza A* Viruses in Mammalian Host Cells. **The Journal of Virology**. n.9, p. 4395–4406, 2010.

CHAIPAN, C., KOBASA. B., BERTRAM, S., GLOWACKA, I., STEFFEN, I., TSEGAYE, T. S., TAKEDA, M., BUGGE, T. H., KIM, S., PARK, Y., MARZI, A., PÖHLMANN, S. Proteolytic Activation of the 1918 *Influenza* Virus Hemagglutinin. **The Journal of Virology**. n.83, p.3200-3211, 2009.

CHUTINIMITKUL, S., HERFST, S., STEEL, J., LOWEN, A. C., YE, J., RIEL, D. V., SCHRAUWEN, E. J.A., BESTEBROER, T. M., KOEL, B., BURKE, D. F., SUTHERLAND-CASH, K. H., WHITTLESTON, C. S., RUSSELL, C. A., WALES, D. J., SMITH, D. J., JONGES, M., MEIJER, A., KOOPMANS, M., RIMMELZWAAN, G. F., KUIKEN, T., OSTERHAUS, A. D. M. E., GARCIA-SASTRE, A., PEREZ, D. R., RON FOUCHIER A.M. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic *Influenza A(H1N1)* virus affects receptor binding. **The Journal of Virology**. n.84, p.11802-13, 2010.

COUCEIRO, J. N. S. S., ALBUQUERQUE, M. C. M. Viroses Respiratórias. In: SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V., WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 2.ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2008. cap.9, p. 245-264.

DE JONG, M.D., SIMMONS, C.P., THANH, T.T., HIEN, V.M., SMITH, G.J., CHAU, T.N., HOANG, D.M., CHAU, N.V., KHANH, T.H., DONG, V.C., QUI, P.T., CAM, B.V., HA, Do. Q., GUAN, Y., PEIRIS, J.S., CHINH, N.T., HIEN, T.T., FARRAR, J. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. **Nature Medicine**. n.12, p.1203–1207, 2006.

EICKMANN, M. **Flu_und_legende_color_c.jpg**, 2006. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/02/Flu_und_legende_color_c.jpg>. Acesso em: 23/06/2011.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**. n.4, p.783-791. 1985.

GABRIEL, G., DAUBER, B., WOLFF, T., PLANZ, O., KLENK, H. D., STECH, J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n.102, p.18590–18595, 2005.

GABRIEL, G., ABRAM, M., KEINER, B., WAGNER, R., KLENK, H. D., STECH, J. Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. **Journal of Virology**. n.81, p.9601–9604, 2007.

GARTEN, R. J., DAVIS, C. T., RUSSELL, C. A., SHU, B., LINDSTROM, S., BALISH, A., SESSIONS, W. M., XU, X., SKEPNER, E., DEYDE, V., OKOMO-ADHIAMBO, M., GUBAREVA, L., BARNES, J., SMITH, C. B., EMERY, S. L., HILLMAN, M. J., RIVAILLER, P., SMAGALA, J., GRAAF, M., BURKE, D. F., FOUCHIER, R. A. M., PAPPAS, C., ALPUCHE-ARANDA, C. M., LÓPEZ-GATELL, H., OLIVERA, H., LÓPEZ, I., MYERS, C. A., FAIX, D., BLAIR, P. J., YU, C., KEENE, K. M., DOTSON JR. P. D., BOXRUD, D., SAMBOL, A. R., ABID, S. H., GEORGE, K. ST., BANNERMAN, T., MOORE, A. L., STRINGER, D. J., BLEVINS, P., DEMMLER-HARRISON, G. J., GINSBERG, M., KRINER, P., WATERMAN, S., SMOLE, S., GUEVARA, H. F., BELONGIA, E. A., CLARK, P. A., BEATRICE, S. T., DONIS, R., KATZ, J., FINELLI, L., BRIDGES, C. B., SHAW, M., JERNIGAN, D. B., UYEKI, T. M., SMITH, D. J., KLIMOV, A. I., COX, N. J. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) *Influenza* Viruses Circulating in Humans. **Science**. n. 325, p.97-201, 2009.

Geneious. Disponível em: < <http://www.geneious.com/default,28,downloads.sm>>. Acesso em: 27/06/11.

GILL, J. R., SHENG, Z., ELY, S. F., GUINEE JR, D. G., BEASLEY, M. B., SUH, J., DESHPANDE, C., MOLLURA, D. J., MORENS, D. M., BRAY, M., TRAVIS, W. D., TAUBENBERGER, J. K. Pulmonary Pathologic Findings of Fatal 2009 Pandemic *Influenza A/H1N1* Viral Infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. n. 134, p. 235, 2010.

GLINSKY, G. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. **Cell Cycle**. n.9, p.958-970; 2010.

GUBAREVA, L. V., KAISER, L., HAYDEN, F. G. *Influenza* virus neuraminidase inhibitors. **The Lancet**. n.355, p.827-35, 2000.

GUBAREVA, L. V., KAISER, L., MATROSOVICH, M. N., SOO-HOO, Y., HAYDEN, F. G. Selection of *Influenza* virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. **The Journal of Infectious Diseases**. n.183, p.523-31, 2001.

HATTA, M., KAWAOKA, Y. The Continued pandemic threat posed by avian *Influenza* viruses in Hong Kong. **Trends in Microbiology**. n.10, p.340-44, 2002.

International Committee on Taxonomy of Viruses. *Orthomyxoviridae*. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2010.

KAO, C.L., CHAN, T.C., TSAI, C.H., CHU, K.Y., CHUANG, S.F. Emerged HA and NA Mutants of the Pandemic Influenza H1N1 Viruses with Increasing Epidemiological Significance in Taipei and Kaohsiung, Taiwan, 2009–10. **PLoS ONE**. n.7, p. e31162, 2012.

KEDWAIL, A., CHRISTMAN, M. C., XU, J., DONIS, R. O., LU, G. Pandemic (H1N1) 2009 virus revisited: An evolutionary retrospective. **Infection, Genetics and Evolution**. n.11, p.803-811, 2011.

KILANDER, A., RYKKVIN, R., DUDMAN, S. G., HUNGNES, O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic *Influenza A(H1N1)* virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. **Eurosurveillance**. n.15, p. 1-3, 2010.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. n. 5, p.150–163, 2004.

KUIKEN, T. E TAUBENBERGER, J. Pathology of Human Influenza Revisited. **Vaccine**. n. 26, p.1-18, 2008.

LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., THORNTON, J. M. Validation of protein models derived from experiment. **Current Opinion in Structural Biology**. n.8, p.631-639, 1998.

LE, Q.M., KISO, M., SOMEYA, K., SAKAI, Y. T., NGUYEN, T. H., NGUYEN, K. H. L., PHAM, N. D., NGYEN, H. H., YAMADA, S., MURAMOTO, Y., HORIMOTO, T., TAKADA, A., GOTO, SUZUKI, H. T., SUZUKI, Y., KAWAOKA, Y. Isolation of drug-resistant H5N1 virus. **Nature**. n. 437, p.1108, 2005.

LESK, A. M., LO, CONTE. L., HUBBARD, T. J. Assessment of novel fold targets in CASP4: predictions of three-dimensional structures, secondary structures, and interresidue contacts. **Proteins**. n.5, p.98-118, 2001.

LI, Z., CHEN, H., JIAO, P., DENG, G., TIAN, G., LI, Y., HOFFMANN, E., WEBSTER, R., G., MATSUOKA, Y., YU. K. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. **Journal of Virology**. n.79, p.12058–12064, 2005.

LIU, Y., CHILDS, R. A., MATROSOVICH, T., WHARTON, S., PALMA, A. S., CHAI, W., DANIELS, R., GREGORY, V., UHLENDORFF, J., KISO, M., KLENK, H., HAY, A., FEIZI, T., MATROSOVICH, M. Altered Receptor Specificity and Cell Tropism of D222G Hemagglutinin Mutants Isolated from Fatal Cases of Pandemic A(H1N1) 2009 *Influenza Virus*. **The Journal of Virology**, n.22, p. 12069–12074. 2010.

LUTHY, R., BOWIE, J. U., EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**. n.356, p.83-5,1992.

MAINES, T. R., JAYARAMAN, A., BELSER, J. A., WADFORD, D. A., PAPPAS, C., ZENG, H., GUSTIN, K. M., PEARCE, M. B., VISWANATHAN, K., SHRIVER, Z. H., RAMAN, R., COX, N. J., SASISEKHARAN, R., KATZ, J. M., TUMPEY, T. M.

Transmission and Pathogenesis of Swine-Origin 2009 A(H1N1) *Influenza* Viruses in Ferrets and Mice. **Science**. n.325, p.484–487, 2009.

MAK, G. C., AU, K. W., TAI, L. S., CHUANG, K. C., CHENG, K. C., SHIU, T. C., LIM, W. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic *Influenza* A (H1N1) with severe disease. **Eurosurveillance**. n.15, p. 1-2, 2010.

MARTIN, P. M.V., MARTIN-GRANEL, E. 2,500-year Evolution of the Term Epidemic **Emerging Infectious Diseases**. n. 6, p.976-980, 2006.

MARTINS, A., LIMA, C., SILVA, N., SILVA, R. **Vírus da gripe um problema ainda por resolver**, Portugal, 2000. Disponível em:<http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2000/virol00_gripe.htm>. Acesso em: 23/06/2011.

MEHLE, A., DOUDNA J. A. Adaptive strategies of the *Influenza* virus polymerase for replication in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n. 50, p. 21312–21316, 2009.

MELO, F., FEYTMANS, E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. **Journal of Molecular Biology**. n.277, p.1141-52, 1998.

MILLER, R. S., MACLEAN, A. R., GUNSON, R. N., CARMAN, W. F. Occurrence of haemagglutinin mutation D222G in pandemic *Influenza* A(H1N1) infected patients in the West of Scotland, United Kingdom, 2009-10. **Eurosurveillance**. n. 16, p.1, 2010.

MILNE, I., BAYER, M., CARDLE, L., SHAW, P., STEPHEN, G., WRIGHT, F., MARSHALL, D. Tablet-next generation sequence assembly visualization. **Bioinformatics**. n. 3, p. 401–402, 2010.

MIRA 3. Disponível em : < http://www.chevreux.org/projects_mira.html>. Acesso em: 27/06/11.

MITTELHOLZER, C. M. **Virus Influenza – Protection and Adaptation**. 2006.61f. Tese (Pós-doutorado) Instituto Karoliska, Estocolmo, Suécia.

MOSCONA, A. Neuraminidase inhibitors for *Influenza*. **New England Journal of Medicine**. n. 13, p.1363-73, 2005.

NCBI. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27/06/11.

NEEDLEMAN, S. B., WUNSCH, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. **Journal of Molecular Biology**. n.48, p.443-53, 1970.

NEUMANN G, N. T., KAWAOKA, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 *Influenza* virus. **Nature**. n.18, p.931-939, 2009.

_____. Host Range Restriction and Pathogenicity in the Context of *Influenza* Pandemic. **Emerging Infectious Diseases**. n. 6, p. 881-889, 2006.

NEUZIL, K. M., REED, G. W., MITCHEL JR, E. F., GRIFFIN, M. R. *Influenza*-associated morbidity and mortality in young and middle-aged women. **The Journal of the American Medical Association**. n. 281, p. 90-7, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic *Influenza* A (H1N1) 2009 viruses. **Boletim Epidemiológico Semanal**, n. 4, p. 21-28, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance**, p. 1-9, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1)**, p. 1-8, 2009.

PALESE, P.; SHAW, M. L. *Orthomyxoviridae: the Viruses and Their Replication*. In: KNIPE, D.M.; GRIFFIN, D.E., LAMB, R.A., STRAUS, S.E., HOWLEY, P.M., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins Publishers, 2007. cap.47, p. 1647-1689.

PALESE, P., BOUVIER, N. M. The biology of *Influenza* viruses. **Vaccine**, p. D49–D53, 2008.

PAN, C., CHEUNG, B., TAN, S., LI, C., LI, L., LIU, S., JIANG, S. Genomic Signature and Mutation Trend Analysis of Pandemic (H1N1) 2009 *Influenza A Virus*. **PLoS ONE**, n. 3, p. e9549. 2010.

PATTERSON, K.D., PYLE, G.F. The diffusion of *Influenza* in sub-Saharan Africa during the 1918±19 pandemic. **Social Science and Medicine**, n.17, p.1299-1307, 1983.

PEVZNER, P. A., TANG, H., WATERMAN, M. S. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n.17, p. 9748 – 9753, 2001.

POTTER, C.W. A history of *Influenza*. **Journal of Applied Microbiology**. n. 91, p. 572-579, 2001.

Products e solutions. Disponível em : < <http://454.com/products-solutions/analysis-tools/gs-de-novo-assembler.asp>>. Acesso em: 27/06/11.

PYLE, G.F. Calamity and Discovery: The Early Twentieth Century. In: PYLE, G.F. **The Diffusion of *Influenza*: Patterns and Paradigms**. New Jersey: Rowan & Littlefield. Cap. 3, p.37-67, 1986.

PUZELLI, S. FACCHINI, M., DE MARCO, M. A., PALMIERI, A., SPAGNOLO, D., BOROS, S., CORCIOLI, TROTTA, D., BAGNARELLI, P. F., AZZI, A., CASSONE, A., REZZA, G., POMPA, M. G., OLEARI, F., DONATELLI, I., Molecular surveillance of pandemic *Influenza A(H1N1)* viruses circulating in Italy from May 2009 to February 2010: association between haemagglutinin mutations and clinical outcome . **Eurosurveillance**. n. 43, p.1-3, 2010.

REID, ANN. H., FANNING, T. G., HULTIN, J. V., TAUBENBERGER, J. K. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” *Influenza* virus hemagglutinin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n. 96, p. 1651–1656, 1999.

REID, A. H., JANCZEWSKI, T. A., LOURENS, R. M., ELLIOT, A. J., DANIELS, R. S., BERRY, C. L., OXFORD, J. S., TAUBENBERGER, J. K.. 1918 influenza pandemic caused

by highly conserved viruses with two receptor-binding variants. **Emerging Infectious Diseases**. n. 9, P.1249–1253, 2003.

SALI, A., BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**. n. 234, p.779-815, 1993.

SAITOU, N., NEI M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**. n. 4, p.406-425, p. 1987.

SÁNCHEZ, R., SALI, A. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. **Proteins**. n.1, p.50-8, 1997.

SÁNCHEZ, R., SALI, A. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n. 95, p.13597-602,1998.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n.12, p.5463-5467, 1977.

SCHNITZLER, S. U., SCHNITZLER, P. An update on swine-origin *Influenza* virus A/H1N1: a review. **Virus Genes**. n. 39, p. 279–292, 2009.

SHEN, J.; MA, J.; WANG, Q. Evolutionary Trends of A(H1N1) *Influenza* Virus Hemagglutinin Since 1918. **PLoS ONE**. n.11, p.e7789, 2009.

STEEL, J., LOWEN, A. C., MUBAREKA, S., PALESE, P. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. **PLoS Pathogens**. n.5, p.e1000252, 2009.

SUBBARAO, E. K., LONDON, W., MURPHY B. R. A Single Amino Acid in the PB2 Gene of *Influenza* A Virus is a Determinant of Host Range. **The Journal of Virology**. n. 4, p. 1761-1764, 1993.

SULLIVAN, S. J., JACOBSON, R. M., DOWDLE, W. R., POLAND, G. A. 2009 H1N1 *Influenza*. **Mayo Clinic Proceedings**. n. 1, p. 64-76, 2010.

SWOFFORD, D. L. PAUP 4.0. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. Sunderland, MA: **Sinauer Associates Incorporated**, 1999. CD.

TAUBENBERGER, J. K., REID, A. H., JANCZEWSKI, T. A., FANNING, T. G. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish *Influenza* virus. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. n. 1416, p. 1829-39, 2001.

TAUBENBERGER, J. K., MORENS, D. M. The Pathology of *Influenza* Virus Infections. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. n. 3, p. 499–522, 2008.

TAUBENBERGER, J. K., MORENS, D. M. *Influenza: The Once and Future Pandemic*. **The Science of Influenza**. n. 3, p.16-26, 2010.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. n.24, p. 4876–4882, 1997.

VÉLEZ, H, S. *Influenza: actualización de conceptos*. **IATREIA**, n 4, p. 233-241, 2002.

XU, L., BAO, L., LV, Q., DENG, W., MA, Y., LI, F., ZHAN, L., ZHU, H., MA, C., QIN C. A single-amino-acid substitution in the HA protein changes the replication and pathogenicity of the 2009 pandemic A (H1N1) *Influenza* viruses in vitro and in vivo. **Virology Journal**. n. 325, p.1-7, 2010.

WEBBY, R. J., SWENSON, S.L., KRAUSS, S.L., GERRISH, P.J., GOYAL, S.M., WEBSTER, R.G. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. **Journal Virology**. n.74, p.8243–8251, 2000.

WEBSTER, R. G., BEAN, W. J., GORMAN, O. T., CHAMBERS, T. M., KAWAOKA, Y. Evolution and Ecology of *Influenza* A Viruses. **Microbiological Reviews**. n.56, p. 152-179, 1992.

WEBSTER, R. G. The importance of animal *Influenza* for human disease. **Vaccine**. n. 20, p. S16–S20, 2002.

WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D.M.; GRIFFIN, D.E., LAMB, R.A., STRAUS, S.E., HOWLEY, P.M., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins Publishers, 2007. cap.48, p. 1691-1738.

YAMADA, S. HATTA, M., STAKER, B. L., WATANABE, S., IMAI, M., SHINYA, K., SAKAI-TAGAWA, Y., ITO, M., OZAWA, M., WATANABE, T., SAKABE, S., LI, C., KIM, J. H., MYLER, P. J., PHAN, I., RAYMOND, A., SMITH, E., STACY, R., NIDOM, C. A., LANK, S. M., WISEMAN, R. W., BIMBER, B. N., O'CONNOR, D. H., NEUMANN, G., STEWART, L. J., KAWAOKA, Y. Biological and Structural Characterization of a Host-Adapting Amino Acid in *Influenza Virus*. **PLoS Pathogens**. n. 8, p. e1001034 1-11, 2010.

ZAMBON, M. Lessons from the 1918 *Influenza*. **Nature Biotechnology**. n. 4, p. 433-434, 2007.

ZHANG, L., Katz, J. M., Gwinn, M., Dowling, N. F., Khoury, M. J. Systems-based candidate genes for human response to *Influenza* infection. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 9, p.1148–1157, 2009.

ZHOU, N.N., SENNE, D.A., LANDGRAF, J.S., SWENSON, S.L., ERICKSON, G., ROSSOW, K., LIU, L., YOON, K., KRAUSS, S., WEBSTER, R.G. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. **Journal of Virology**. n.73, p.8851–8856. 1999.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°016/2010-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** FATORES GENÉTICOS, IMUNOLÓGICOS E VIROLÓGICOS RELACIONADOS À GRAVIDADE DA GRIPE CAUSADA PELO VÍRUS A(H1N1) PÂNDEMICO.
3. **Pesquisador Responsável:** Rita Catarina Medeiros Souza.
4. **Instituição / Unidade:**UFPA E IEC.
5. **Data de Entrada:** 31/03/2010.
6. **Data do Parecer:** 07/04/2010.

PARECER



O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 18 de junho de 2010.

Profº Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

10.2. ANEXO B

<p>MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE</p>  <p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</p>
<p>Parecer de Aprovação nº 0042/2011 Protocolo CEP/IEC - Nº 0022/2011 CAAE: 0021.0.072.000-11</p>
<p>Ananindeua/PA, 24 de novembro de 2011.</p>
<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS</p>
<p><u>Projeto:</u> “Epidemiologia Molecular do vírus <i>Influenza A (H1N1)</i> pandêmico: investigação de determinantes de patogenicidade nos genes codificadores da hemaglutinina e PB2”</p>
<p>Pesquisador Responsável: Mirleide Cordeiro dos Santos</p>
<p>Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epígrafe foi considerado <u>aprovado</u>. Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto. Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Deverá ser encaminhado relatório semestral e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.</p>
 <p>MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES Coordenador do CEP/IEC</p>
<p>AV. ALMIRANTE BARROSO, 492 – BAIRRO MARCO – CEP: 66090-000 – BELÉM-PA – C.N.P.J.: 26.989.350/0489-09 FONE: (091) 246-6422 – FAX: (091) 266-4669 RODOVIA BR 316 – KM 07, SNº - BAIRRO - LEVILÂNDIA – CEP: 67.030-000 – ANANINDEUA-PA – FONE: (091) 214-2000 http://www.iec.pa.gov.br</p>