



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

LUANA SOARES BARBAGELATA

**PERFIL GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA DO VÍRUS *Influenza A* (H1N1)
PANDÊMICO AOS INIBIDORES DA NEURAMINIDASE EM PACIENTES
PROCEDENTES DA MESORREGIÃO DE BELÉM NO PERÍODO DE MAIO DE
2009 A MAIO DE 2012**

Belém-Pará
2012

LUANA SOARES BARBAGELATA

**PERFIL GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA DO VÍRUS *Influenza A* (H1N1)
PANDÊMICO AOS INIBIDORES DA NEURAMINIDASE EM PACIENTES
PROCEDENTES DA MESORREGIÃO DE BELÉM NO PERÍODO DE MAIO DE
2009 A MAIO DE 2012**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais - Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa

Belém-Pará

2012

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

Barbagelata, Luana Soares.

Perfil genotípico de resistência do vírus influenza A (H1N1) pandêmico aos inibidores da neuraminidase em pacientes procedentes da mesorregião de Belém no período de maio de 2009 a maio de 2012 / Luana Soares Barbagelata; orientadora, Rita Catarina Medeiros Sousa. – 2012

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

1. Influenza. 2. Vírus influenza. 3. Belém (PA). 4. Agentes antivirais. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.203

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira Moreira, NMT/UFPA



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

LUANA SOARES BARBAGELATA

**PERFIL GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA DO VÍRUS *Influenza A (H1N1)*
PANDÊMICO AOS INIBIDORES DA NEURAMINIDASE EM PACIENTES
PROCEDENTES DA MESORREGIÃO DE BELÉM NO PERÍODO DE MAIO DE
2009 A MAIO DE 2012**

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

Aprovado em: ___/___/___

Conceito: _____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa
Orientadora – NMT/UFPA

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos
Avaliador – ICB/UFPA

Dra. Luana da Silva Soares
Avaliador – SEÇÃO DE VIROLOGIA/IEC

Dr. Túlio Machado Fumian
Avaliador – SEÇÃO DE VIROLOGIA/IEC

Dr. Fernando Neto Tavares
Suplente – SEÇÃO DE VIROLOGIA/IEC

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha amada e querida filha Beatriz, aos meus pais e irmão por toda a dedicação e apoio e ao meu marido Leno, companheiro de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Deus por ter me dado força, saúde e iluminado o meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, pelo cuidado e dedicação, por serem as pessoas que mais me apoiam e acreditam na minha capacidade. Meus agradecimentos pelos momentos em que ficaram do meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, e por nunca terem medido esforços para que eu chegasse até aqui, vocês são um exemplo pra mim. Também agradeço ao meu irmão Carlos, pois sei que sempre torce para que eu realize os meus sonhos.

Ao meu anjinho, minha filha Beatriz, que mesmo sendo tão pequena e não entendendo o que estava acontecendo, me dava tanta força e alegria para continuar. Criança linda, que trouxe paz e alegria para minha vida, com quem aprendo, cresço e me realizo todos os dias. Ao meu companheiro Leno, pessoa com quem amo compartilhar a minha vida, sua alegria e bom humor tornam os meus dias bem mais agradáveis, admirável por ser uma pessoa tão honesta e trabalhadora. Obrigada pelo carinho e companheirismo.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa da diretora Dr^a. Elisabeth Santos e a Seção de Virologia no nome do Dr. Alexandre Linhares, por me acolherem desde minha iniciação científica e permitirem o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Núcleo de medicina Tropical - UFPA no nome da coordenação e de todos os professores que contribuíram para a minha formação.

A FAPESPA pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha querida orientadora Dr^a. Rita Medeiros, por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento profissional desde minha iniciação científica. Mulher que admiro muito pela sua garra e serenidade. Obrigada por toda paciência, apoio e ensinamentos durante todos esses anos.

Ao Dr. Wyller Mello por todas as oportunidades que tive no laboratório de Vírus Respiratórios, por confiar no meu trabalho e por todos os conhecimentos repassados.

A Milla por tudo que me ensinou. Com ela aprendi como se trabalha em um laboratório de pesquisa. Obrigada por me ensinar a fazer ciência, por acreditar

em mim, por me orientar no dia-a-dia da bancada, sempre disponível quando eu tinha dúvidas, e obrigada pela sua amizade, você foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos Jessy e James por todos os momentos que passamos juntos. Por dividirem comigo as dúvidas, as angústias, as preocupações e as alegrias. Obrigada pelos momentos de descontração que tornaram esses meses bem mais agradáveis, pela amizade, por toda ajuda e pelo incentivo que vocês me deram.

Ao Edivaldo meu muitíssimo obrigada por realizar com qualidade e paciência as análises nas sequências obtidas, contribuindo grandemente para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Vírus Respiratórios Luís, Alvino, Pacheco, Akim e Rodrigo por todo apoio.

A Edna pela amizade, ajuda e conversas durante todos esses anos.

A todos os servidores, contratados e estagiários da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, minha segunda casa, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Aos amigos e professores que tive durante a graduação e pós-graduação pelo convívio e aprendizado.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

Quem avança confiante na direção de seus sonhos e se empenha em viver a vida que imaginou para si encontra um sucesso inesperado em seu dia-a-dia.

Henry Ford

RESUMO

O vírus *Influenza* é o responsável pela gripe, uma doença que ocasiona milhões de mortes e hospitalizações todos os anos. Nas infecções severas, especialmente em pessoas com risco para complicações, os antivirais tornam-se os principais meios para o manejo clínico, merecendo especial destaque os inibidores da neuraminidase (INAs). De fato, na pandemia de 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou o uso do oseltamivir para o tratamento dos doentes. Porém, devido à evolução genética viral, surgiram cepas com mutações no gene codificador da neuraminidase (NA) responsáveis por substituições aminoacídicas que levam à resistência aos fármacos INAs. Assim, a OMS passou a recomendar a vigilância de resistência genotípica para os vírus *Influenza*. Este trabalho teve como objetivos verificar a ocorrência de mutações no gene codificador da NA dos vírus *Influenza A (H1N1)* pandêmico que possam estar relacionadas à resistência aos INAs em cepas circulantes na mesorregião metropolitana de Belém no período de maio de 2009 a maio de 2012 e analisar, através da modelagem de proteínas, as substituições aminoacídicas da NA que possam estar influenciando na conformação protéica. Durante o período de estudo, foram recebidas no Laboratório de Vírus Respiratórios 2619 amostras clínicas de pacientes que apresentavam sinais e sintomas de infecção respiratória aguda com até cinco dias de evolução. Para a detecção do genoma viral foi feita a extração do RNA viral, seguida de RT-PCR em tempo real utilizando marcadores específicos para *Influenza A H1N1pdm*, resultando em 744 (28,4%) positivas. Parte das amostras positivas foram então inoculadas em células MDCK. Para as amostras isoladas em cultura de células, foi feita uma nova extração do RNA viral seguida de uma RT-PCR e semi-nested (PCR) utilizando iniciadores específicos para o gene NA, e posterior análise em sequenciador automático *ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems)*. A modelagem molecular da NA foi realizada através dos softwares SWISS-MODEL, MODELLER 9.10, PROCHECK, VERIFY3D e PYMOL. A análise parcial das sequências da neuraminidase nas amostras sequenciadas mostrou que não houve a circulação de cepas de vírus H1N1pdm com a mutação H275Y, a principal envolvida na resistência ao oseltamivir. Porém, em duas amostras foi identificada a substituição D199N que já foi relatada em vários estudos mostrando uma possível associação com o aumento da resistência ao oseltamivir. As amostras de 2012 apresentaram duas substituições (V241I e N369K) que estão relacionadas com um possível papel na compensação dos efeitos negativos causados pela mutação H275Y. A modelagem molecular mostrou que na mutação D199N houve uma alteração na estrutura da proteína NA próxima ao sítio de ligação ao antiviral. A análise filogenética revelou que as amostras de 2012 formaram um *cluster* isolado, demonstrando uma variação muito mais temporal do que geográfica. Este representa o primeiro estudo de resistência dos vírus *Influenza H1N1pdm* na mesorregião metropolitana de Belém, representando um importante instrumento para que os profissionais de saúde adotem estratégias mais eficazes no manejo da doença e no desenvolvimento de novos fármacos anti-influenza.

Palavras-chave: Influenza. Neuraminidase. Resistência. Antivirais.

ABSTRACT

Influenza virus is responsible for the flu, a disease that causes millions of hospitalizations and deaths every year. In severe infections, especially in people at risk with comorbidities for complications, antiviral become the main means for clinical management, mainly the neuraminidase inhibitors (INAs). By fact, in the 2009 pandemic episode the World Health Organization (WHO) recommends the use of Oseltamivir for the treatment of patients. However, due to viral genetic evolution emerged strains with mutations in the gene coding for the neuraminidase (NA) responsible for amino acid substitutions that lead to drug resistance INAs. Thus, WHO began recommending surveillance genotypic resistance to influenza viruses. Our study aimed to verify the occurrence of mutations in the NA encoding gene of Influenza virus A (H1N1) pandemic strains that could be related to INAs resistance in the Belém mesoregion from May 2009 to May 2012 and analyze, through modeling of proteins, NA amino acid substitutions that may be altering the protein conformation. During the study period, were received 2619 clinical samples at the Virus Respiratory Lab in Evandro Chagas Institute in Belém – Brazil, from patients presenting signs and symptoms of acute respiratory infection with up to five days from the start of symptoms. For the detection of the viral genome viral RNA extraction was made followed by real time RT- PCR using specific markers for Influenza A H1N1pdm, resulting in 744 (28.4%) positive samples. A portion of the positive samples were then inoculated in MDCK cells and isolated samples were then submitted to a new viral RNA extraction followed by real time RT-PCR and semi-nested reaction (PCR) using primers specific for the NA gene. Subsequent analysis was done in 3130xl ABI Prism automatic sequencer (Applied Biosystems). Molecular modeling was performed to the NA gene using SWISS-MODEL software, MODELLER 9.10, Procheck, VERIFY3D and PYMOL. The analysis of partial sequences of neuraminidase showed no circulation of the H1N1 pdm with H275Y mutation, the principal involved in resistance to oseltamivir. However in two samples were identified the D199N substitution that has been reported in several studies showing a possible association with increased resistance to oseltamivir. The samples of 2012 showed two substitutions (V241I and N369K) which are relate to a possible role in offsetting the negative effects caused by the H275Y mutation. Molecular modeling shows that the mutation D199N caused a change in protein structure near the NA-antiviral binding site. Phylogenetic analysis revealed that 2012 samples formed an isolated cluster, showing a much more temporal variation than geographic. This represents the first study of drug resistance of influenza virus in H1N1pdm metropolitan mesoregion of Belém - Brazil an important tool for health professionals to adopt more effective strategies for disease management and the development of new anti-influenza drugs.

Keywords: Influenza. Neuraminidase. Resistance. Antivirals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Páginas
Figura 1 - Surgimento de vírus da gripe pandêmicos durante o século XX.	27
Figura 2 - Fases pandêmicas.	31
Figura 3 - Microscopia eletrônica do vírus <i>Influenza A</i> (H1N1) pdm isolados de cultura de célula de rim de cães (MDCK).	32
Figura 4 - Representação esquemática da partícula viral do vírus <i>Influenza A</i> .	33
Figura 5 - Esquema representativo do genoma do vírus <i>Influenza A</i> .	35
Figura 6 - Resíduos de ácido siálico ligados a galactose através das ligações SA α 2,6Gal e SA α 2,3Gal e especificidade de ligação entre as espécies.	38
Figura 7 - Representação do ciclo replicativo do vírus <i>Influenza</i> .	40
Figura 8 - Mutações e rearranjos gerados por <i>drifts</i> e <i>shifts</i> antigênicos.	41
Figura 9 - Representação da estrutura da neuraminidase do vírus <i>Influenza A</i> .	43
Figura 10 - Microscopia eletrônica de células MDCK infectadas com o vírus <i>Influenza</i> .	45
Figura 11 - Origem genética do vírus <i>Influenza A</i> (H1N1) pdm 2009.	46
Figura 12 - Mecanismo de ação dos inibidores da neuraminidase.	52
Figura 13 - Alteração conformacional na presença da mutação H274Y.	57
Figura 14 - Antivirais agindo nos diferentes estágios do ciclo replicativo.	61

Figura 15 - Ocorrência sazonal das amostras positivas para H1N1 pdm nos anos de 2009 e 2010.	75
Figura 16 - Alinhamento de aminoácidos da NA do vírus <i>Influenza A</i> H1N1 pdm.	76
Figura 17 - Modelagem protéica da substituição D199N.	77
Figura 18 - Modelagem protéica das substituições V241I e N369K.	78
Figura 19 - Árvore Filogenética da sequência parcial em nucleotídeos do gene NA.	79

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Páginas
Tabela 1 - Distribuição dos casos de <i>Influenza</i> (H1N1) pdm por região geográfica. SE 16 a 52/2009.	30
Tabela 2 - Distribuição dos casos de <i>Influenza</i> (H1N1) pdm por região geográfica. SE 1 a 35/2010.	30
Tabela 3 - Número de amostras recebidas e positivas para H1N1 pdm no período de estudo.	74
Tabela 4 - Distribuição por faixa etária/sexo das amostras sequenciadas.	75
Quadro 1 - Produtos gênicos codificados pelos segmentos de RNA do vírus <i>Influenza A</i> .	36
Quadro 2 - Dosagem de oseltamivir por peso e frequência diária.	54
Quadro 3 - Mutações encontradas nos vírus <i>Influenza A</i> e B relacionadas a resistência.	58
Quadro 4 - Antivirais em desenvolvimento para o tratamento da gripe.	60
Quadro 5 - Descrição do volume de cada reagente que deve constituir a <i>mix</i> por reação.	65
Quadro 6 - Sequência de <i>primers</i> e sondas utilizadas na RT-PCR em tempo real.	66
Quadro 7 - Interpretação dos resultados da RT-PCR em tempo real.	66
Quadro 8 - Sequência de <i>primers</i> utilizados na RT-PCR e semi-nested (PCR).	69
Quadro 9 - Sequência de <i>primers</i> utilizados na reação de sequenciamento do gene NA.	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1. Generalidades:

ANF	Aspirado nasofaríngeo
AS α 2,3Gal	Ácido siálico ligado a galactose por uma ponte α 2,3
AS α 2,6Gal	Ácido siálico ligado a galactose por uma ponte α 2,6
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HA	Reação de hemaglutinação
HI	Inibição de hemaglutinação
IF	Imunofluorescência
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MDCK	Cultura de células de rim canino (<i>Madin Darbin Canine Kidney</i>)
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
pdm	Pandêmico
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RSI	Regulamento Sanitário Internacional
RT-PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcriptase reversa
SC	Swab combinado
SE	Semana epidemiológica
SESPA	Secretaria Estadual de Saúde
SN	Secreção nasofaríngea

SNC	Sistema Nervoso Central
SG	Síndrome Gripal
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SUS	Sistema Único de Saúde
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	19
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. GERAL.....	22
3.2. ESPECÍFICOS.....	22
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
4.1. HISTÓRICO.....	23
4.1.1. Pandemia de 1918 - Gripe Espanhola (H1N1)	24
4.1.2. Pandemia de 1957 - Gripe Asiática (H2N2)	25
4.1.3. Pandemia de 1968 - Gripe Hong Kong (H3N2).....	26
4.1.4. Gripe Russa (H1N1) - 1977	26
4.1.5. Pandemia de 2009 - Gripe Suína (H1N1)	27
4.2. O VÍRUS INFLUENZA	31
4.2.1. Classificação	31
4.2.2. Estrutura das partículas virais e organização genômica	32
4.2.3. Replicação viral	37
4.2.4. Variação antigênica.....	40
4.2.5. <i>Influenza</i> em aves e suínos	42
4.2.6. Neuraminidase.....	43
4.3. O VÍRUS INFLUENZA A (H1N1) PANDÊMICO.....	45
4.3.1. A origem genética	45
4.3.2. Transmissão e sintomatologia.....	47

4.3.3. Diagnóstico.....	48
4.3.4. Tratamento e profilaxia.....	49
4.3.4.1. Antivirais desenvolvidos para o tratamento da gripe	50
4.3.4.2. Resistência aos inibidores da neuraminidase.....	55
4.3.4.3. Antivirais em desenvolvimento para o tratamento da gripe	58
5. MATERIAL E MÉTODOS	62
5.1. TIPO DE ESTUDO.....	62
5.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	62
5.3. AMOSTRAS.....	62
5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	63
5.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	63
5.6. TAMANHO AMOSTRAL.....	63
5.7. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	64
5.8. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL (RNA _v)	64
5.9. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) EM TEMPO REAL.....	64
5.10. ISOLAMENTO VIRAL.....	67
5.11. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	67
5.11.1. Extração do RNA viral.....	68
5.11.2. Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) seguida de semi-nested (PCR).....	68
5.11.3. Purificação e quantificação do produto do semi-nested (PCR).....	69
5.12. SEQUENCIAMENTO DO GENE DA NEURAMINIDASE.....	70
5.12.1. Método de Sanger	70

5.12.2. Precipitação da Reação de Sequenciamento	70
5.12.3. Eletroforese em sequenciador automático	71
5.12.4. Alinhamento, edição das sequências e construção da árvore filogenética.	71
5.13. MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS.....	72
5.13.1. Alinhamento do modelo estrutural (<i>template/alvo</i>).....	72
5.13.2. Construções do Modelo	73
5.13.3. Avaliação dos Modelos.....	73
5.14. AVALIAÇÃO ÉTICA DA PESQUISA.....	73
6. FONTES FINANCIADORAS.....	74
7. RESULTADOS.....	74
8. DISCUSSÃO	80
9. CONCLUSÃO	82
10. REFERÊNCIAS.....	83
11. ANEXO.....	95

1. INTRODUÇÃO

A gripe é uma doença infecciosa aguda de origem viral, que acomete o trato respiratório e anualmente atinge cerca de 500 milhões de pessoas em todo o mundo (GERDIL, 2003). A cada inverno mais de 100 milhões de pessoas adquirem a doença e crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos podem desenvolver complicações mais sérias como broncopneumonia, podendo ser fatal (MONTO, 2002; OXFORD e LAMBKIN, 1998).

Trata-se de uma doença que causa epidemias anuais e, ocasionalmente, pandemias, como as que ocorreram no século passado: A espanhola de 1918, a asiática em 1957, e em 1968, a de Hong Kong (NEUMANN et al., 2009; VÉLEZ, 2002).

Os agentes responsáveis pela gripe são os vírus *Influenza* de tipo A, B e C. Os vírus de tipo A são os responsáveis por pandemias ou epidemias mais severas no homem que os vírus de tipo B e C. Segundo a espécie molecular das duas glicoproteínas de superfície viral, a hemaglutinina (H1-H17) e a neuraminidase (N1-N9), os vírus de tipo A são divididos em subtipos sorológicos (FOUCHIER et al., 2005; TONG et al., 2012).

A cada ano, cerca de 5 a 15% da população é infectada pelo vírus da gripe. A mortalidade ligada diretamente à infecção viral, ou resultante de uma infecção bacteriana secundária, atinge em média 0,1% dos doentes em períodos interpandêmicos. Nos Estados Unidos, são aproximadamente 1.68 milhão de hospitalizações e 41.400 óbitos por ano (LOWEN et al., 2007).

Em março/abril de 2009 a emergência do vírus *Influenza A (H1N1)* de origem suína na população humana, no norte do México, colocou o mundo todo em alerta quanto ao risco potencial de pandemia de gripe por esse vírus. Esta foi a primeira pandemia de gripe do século XXI (GATHERER, 2009). No Brasil, foram confirmados laboratorialmente 46.853 casos e 2.146 óbitos por *Influenza* pandêmico durante os anos de 2009 e 2010 (BRASIL, 2010a).

Casos mais graves e mortes ocorreram principalmente entre indivíduos adultos jovens, a exemplo do que ocorreu durante a pandemia de gripe espanhola em 1918 (NEUMANN et al., 2009).

O tratamento etiológico da gripe baseia-se na utilização de antivirais eficazes, inibidores das proteínas virais neuraminidase (NA) e M2. A ação dos inibidores da NA é bloquear a liberação da partícula viral durante o processo de replicação (MANUGUERRA e VAN DER WERF, 1999; 2002). Durante a pandemia de 2009/2010 foi preconizado o uso dos inibidores da NA (oseltamivir, zanamivir e peramivir), pois estudos demonstraram que a cepa circulante, *Influenza A* (H1N1) pdm, era resistente aos inibidores da proteína M2, amantadina e rimantadina (DEYDE et al., 2010; MEMOLI et al., 2009).

Vários estudos com os vírus *Influenza* sazonais e pandêmicos demonstram que alterações nos sítios alvos das drogas determinam resistência ao tratamento e cepas com essas alterações podem propagar-se rapidamente na população (DAHRAN et al., 2009; MAURER-STROH et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

O vírus *Influenza* é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade na população humana em todo mundo, tanto nos períodos pandêmicos quanto nos interpandêmicos. Durante a pandemia de gripe causada pelo vírus H1N1 de origem suína em 2009/2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou que o tratamento de infecções causadas por esse vírus fosse feito com inibidores da neuraminidase viral, uma glicoproteína de superfície do vírus da gripe que é responsável pela liberação e disseminação das partículas virais neoformadas.

Por ser uma ferramenta importante no manejo e prevenção da gripe, a OMS recomenda ainda, a vigilância para monitoramento de vírus resistentes aos inibidores de neuraminidase, pois vários estudos mostraram que cepas resistentes podem se propagar e se estabelecer rapidamente na população. Assim, a vigilância de mutações no gene codificador da neuraminidase dará mais subsídios na concepção de estratégias de intervenção terapêutica e de vacinas que poderão minimizar a morbidade, ocasional mortalidade e extensos encargos econômicos associados à doença, contribuindo para melhor controle e melhor manejo clínico da gripe no mundo.

A região Amazônica apresenta diferente perfil sazonal para a gripe quando comparada ao resto do Brasil, sendo sempre mais proeminente a circulação viral nos meses mais chuvosos, em comparação com as regiões sul e sudeste, onde a circulação viral é no inverno. Assim tornam-se estratégicos estudos sobre o perfil de sensibilidade aos antineuraminidase dos vírus *Influenza* circulantes na região Amazônica.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Descrever o perfil de resistência genotípica das cepas de vírus *Influenza A* (H1N1) pdm circulantes na mesorregião metropolitana de Belém, Pará, Brasil nos anos de 2009 a 2012.

3.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar o gene codificador da neuraminidase do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm em casos de gripe na população estudada;
- Identificar eventuais substituições aminoacídicas na neuraminidase que possam estar relacionadas com a resistência do vírus *Influenza* aos antivirais.
- Analisar, através de modelagem de proteínas, as substituições aminoacídicas da neuraminidase que possam estar influenciando na conformação proteica.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. HISTÓRICO

Historiadores da medicina afirmam que a gripe era conhecida desde a antiguidade, quando já se descrevia uma doença com aspectos muito semelhantes à doença que conhecemos hoje como gripe. A primeira descrição clínica foi relatada por Hipócrates em 412 a.C. Há relatos históricos de infecções compatíveis com aquelas causadas pelo vírus da *Influenza* 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; TALAVERA, 1999; VALDEZ, 2002).

Foram descritos, na Idade Média, numerosos episódios relacionados à doença e o primeiro relato no continente Americano ocorreu em Texcoco no México em 1552 (KOLATA, 1999; VALDEZ, 2002).

O termo *Influenza* se originou na Itália no século XV, pois acreditava-se que os sinais clínicos de febre, tosse e calafrios ocorriam por “influência” das estrelas. O termo foi adotado pelos ingleses no século XVIII, durante o mesmo período os franceses denominaram a enfermidade como “*La grippe*” (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; TALAVERA, 1999; VELÉZ, 2002).

A primeira amostra desse vírus foi isolada entre suínos em 1930 (SHOPE, 1931), mas somente em 1933, Smith, Andrews e Laidlaw conseguiram isolar o vírus *Influenza* de origem humana (do tipo A).

O primeiro registro de uma pandemia de *Influenza* data de 1580, a qual originou-se na Ásia e, em seguida, espalhou-se para África e Europa. Esta pandemia se destacou pela sua grande difusão para outros países e pela sua virulência, pois a mortalidade foi elevada em algumas cidades (POTTER, 2001; TALAVERA, 1999; VALDEZ, 2002). No decorrer do século outras pandemias aconteceram. Durante o período de 1830 a 1833 teve início na China uma pandemia que em termos de gravidade foi comparada a pandemia de 1918, onde apresentou uma taxa de 20 - 25% da população afetada. Em 1889 ocorreu outra grande pandemia que se iniciou na Rússia tendo levado à morte 40 a 50 milhões de

peças (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; POTTER, 2001; TALAVERA, 1999).

Durante o século XX, ocorreram três pandemias: as gripes espanhola (1918), asiática (1957) e Hong Kong (1968).

4.1.1. Pandemia de 1918 - Gripe Espanhola (H1N1)

A pandemia de 1918/1919 continua sem precedentes de severidade, matou mais pessoas do que a Primeira Guerra Mundial e reduziu a expectativa de vida dos Estados Unidos em 10 anos. A maior pandemia do século XX matou cerca de 50 milhões de pessoas no mundo inteiro, mais de 500.000 mortes foram registradas nos Estados Unidos e autoridades estimam 20 milhões de mortes só na Índia. A Aids foi responsável pela morte de 25 milhões de pessoas nos seus primeiros 25 anos, a gripe espanhola matou o equivalente em 25 semanas (de setembro de 1918 a março de 1919). Acredita-se que um terço da população mundial (aproximadamente 500 milhões de pessoas) foi infectada (TAUBENBERGER et al., 2001).

A pandemia de 1918 percorreu o mundo em três ondas, a primeira leve na primavera de 1918 que não apresentou uma taxa de mortalidade acima do normal. Uma segunda onda aconteceu de setembro a novembro de 1918 e foi altamente fatal, resultando em taxas de mortalidade de mais de 2,5%, comparado a menos de 0,1% tipicamente registrado para as epidemias de gripe. Em muitos países, uma terceira onda ocorreu no início de 1919 com a mesma taxa de mortalidade (NEUMANN et al., 2009; TALAVERA, 1999; TAUBENBERGER E MORENS, 2006; WRIGHT et al., 2007).

A gripe espanhola recebeu esse nome devido ao surgimento de casos de gripe entre civis na Espanha, país neutro na Segunda Guerra Mundial, depois de circular, por algum tempo, entre soldados dos exércitos americano e britânico. A origem dessa pandemia é controversa, especula-se que a primeira de suas ondas possa ter sido originada em Fort Riley (Kansas, Estados Unidos), associada a um quadro respiratório benigno em um soldado que trabalhava na limpeza de chiqueiros de porcos (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008).

O Padrão de morbidade foi similar ao de outras pandemias, ou seja, crianças abaixo de 15 anos experimentaram as taxas mais altas de contágio. Entretanto, o padrão de mortalidade era incomum com taxas altas em adultos jovens. A taxa de mortalidade para o grupo de 15 - 35 anos de idade foi 20 vezes maior na pandemia de 1918 do que em outros anos e pessoas com idade inferior a 65 anos representaram mais de 99% do excesso de óbitos. Em relação aos sintomas, o início era repentino, com febre alta, cefaléia, mialgia, tosse, faringite e coriza. Achados patológicos mostraram que a infecção foi restrita ao trato respiratório, sem evidências de infecção sistêmica. A maioria dos pacientes morreu em consequência de pneumonia bacteriana, que deve ser atribuída a ausência de antibióticos em 1918 - 1919 (NEUMANN et al., 2009; WRIGHT et al., 2007).

Embora o vírus da gripe espanhola não tenha sido isolado durante a pandemia, as sequências genômicas desse vírus foram posteriormente determinadas e revelaram um vírus similar a um H1N1 aviário da mesma época que contém uma assinatura de aminoácidos do tipo humana em várias proteínas (figura 1) (NEUMANN et al., 2009; WRIGHT et al., 2007).

4.1.2. Pandemia de 1957 - Gripe Asiática (H2N2)

Esta pandemia originou-se no sul da China, na província de Guizhou em fevereiro de 1957. Depois se espalhou para Cingapura (março, 1957), Hong Kong (abril, 1957), Japão (maio, 1957), Estados Unidos e Reino Unido (outubro, 1957). O surgimento do vírus da gripe asiática foi detectado pela primeira vez em abril de 1957 e foi isolado em maio no Japão. Uma segunda onda ocorreu em janeiro de 1958 (WRIGHT et al., 2007; TAUBENBERGER E MORENS, 2010).

Pesquisadores conseguiram rastrear sua disseminação geográfica com facilidade, o que não foi possível na pandemia de 1918. O vírus que causou a pandemia de 1957 foi um descendente direto do vírus H1N1 da pandemia de 1918. A pandemia foi causada por um rearranjo humano/ave que introduziu os genes H2 de HA e N2 de NA de vírus aviários na população humana. Além disso, o vírus da gripe asiática também possuía um gene PB1 original de vírus aviário (NEUMANN et al., 2009; TAUBENBERGER E MORENS, 2010).

O vírus da pandemia de 1957 não foi altamente patogênico, o aumento da mortalidade foi atribuído à falta de imunidade pré-existente entre os seres humanos para as novas glicoproteínas de superfície do vírus. Grande parte dos óbitos ocorreu por pneumonia bacteriana secundária. A faixa etária de 5 - 19 anos apresentou alta taxa de infecção, sendo que nos Estados Unidos ocorreram cerca de 80.000 mortes, chegando a um total de 1 milhão de mortes, aproximadamente, em todo o mundo (POTTER, 2001; WRIGHT et al., 2007).

4.1.3. Pandemia de 1968 - Gripe Hong Kong (H3N2)

Em 1968, o vírus do subtipo H2N2 foi substituído por outro vírus resultante do rearranjo humano/ave que possuía um gene H3 de HA de origem aviária, assim como o gene PB1 que também era procedente de um vírus aviário (figura 1). Outros seis segmentos gênicos, incluindo o gene NA, se mantiveram os mesmos do vírus *Influenza A* (H2N2) da pandemia de 1957. Isso poderia explicar o fato de o novo subtipo H3N2 não ter causado uma pandemia tão severa como as anteriores, pois a população já apresentava uma imunidade parcial contra o novo vírus.

Os primeiros sinais da nova pandemia foram observados no verão de 1968, no sul da Ásia, e o vírus foi isolado pela primeira vez em Hong Kong, em julho de 1968 e se espalhou ao redor do mundo nos invernos de 1968 - 1969 e 1969 - 1970. A faixa etária de 10 - 14 anos foi a que apresentou o maior número de infecções. Nos Estados Unidos uma estimativa de 33.800 pessoas morreram da gripe de Hong Kong. Este vírus tornou-se rapidamente endêmico, causando surtos e epidemias sazonais e circula até hoje no mundo todo (NEUMANN et al., 2009; TAUBENBERGER E MORENS, 2010; WRIGHT et al., 2007).

4.1.4. Gripe Russa (H1N1) - 1977

Em maio de 1977, uma epidemia viral de gripe foi relatada em Tianjin, na China. Crianças em idade escolar apresentaram taxa de infecção maior que 50%, porém a taxa de morbidade foi limitada, quase que exclusivamente, a adultos jovens, sugerindo que pessoas mais velhas apresentavam uma imunidade pré-existente. Esta hipótese foi comprovada, pois a epidemia foi causada por um vírus da gripe do

subtipo H1N1 que se assemelhava muito aquele que circulou no início da década de 50, sugerindo liberação acidental desse vírus a partir de amostras de laboratório. O ressurgimento do vírus H1N1 não substituiu o vírus H3N2 circulante até o momento, ambos os subtipos estão em co-circulação em humanos até hoje (figura 1) (NEUMANN et al., 2009; WRIGHT et al., 2007).

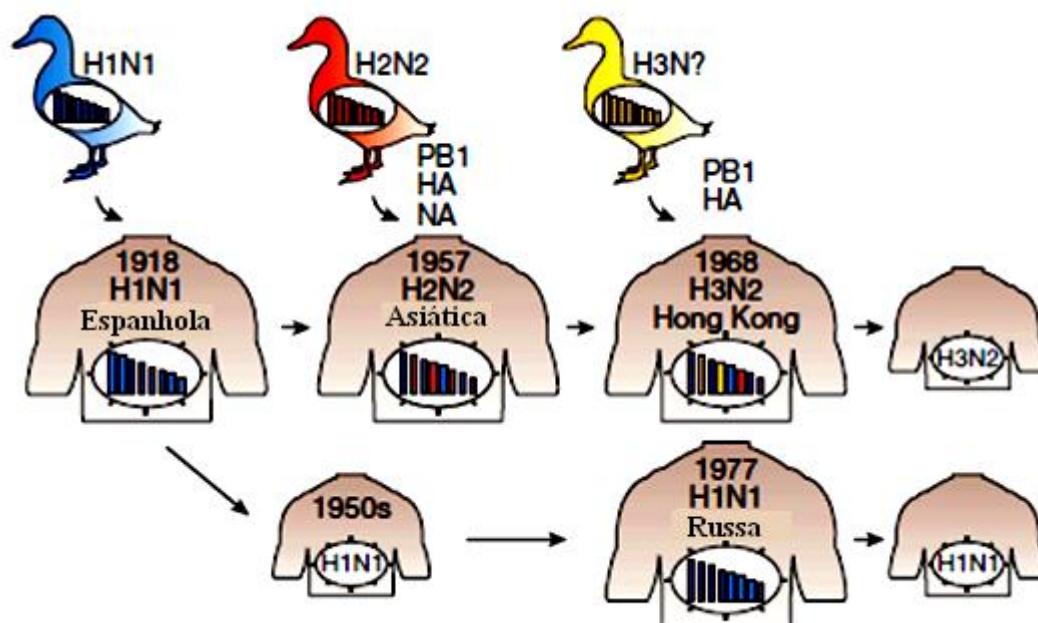


Figura 1: Surgimento de vírus da gripe pandêmicos durante o século XX.
Fonte: Neumann et al., 2009.

4.1.5. Pandemia de 2009 - Gripe Suína (H1N1)

Dados epidemiológicos indicam que em meados de fevereiro de 2009 uma doença respiratória similar a gripe iniciou-se na cidade mexicana de La Gloria. No período de março a abril foi observado que os casos de síndrome gripal (SG) não reduziram conforme o esperado para os meses de março a maio e simultaneamente foram identificados surtos de SG em outras localidades da região central do México (Veracruz, Tlaxcala e San Luis Potosi). A ocorrência de um caso atípico de pneumonia, em 15 de abril, em uma mulher no estado de Oaxaca, mais ao sul do país, aumentou o nível de alerta. No princípio de abril autoridades de saúde pública do México iniciaram uma investigação sobre os números elevados de doenças pulmonares e gripais, e informaram a Organização de Saúde Pan-Americana (PAHO), o escritório regional da Organização Mundial de Saúde (OMS), de uma possível epidemia (BRASIL, 2010a; NEUMANN et al., 2009)

Nos Estados Unidos da América (EUA), no final de março, foram identificados dois casos, no sul da Califórnia, com quadro clínico similar e que não tinham qualquer vínculo, um dos casos foi de um garoto de 10 anos com asma, que apresentou no início da doença febre, vômito e tosse, o outro foi de uma menina de nove anos que apresentou febre e tosse. Ambos os casos foram testados laboratorialmente e indicavam *Influenza A*, porém negativos para os subtipos que circulavam anualmente em humanos (H1 e H3), sem possibilidade de subtipagem pelos métodos disponíveis, sugerindo uma possível mutação.

No dia 15 de abril o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC/EUA) recebeu a amostra clínica do garoto de 10 anos e identificou o novo vírus *Influenza A* (H1N1) de origem suína e notificou o Departamento de Saúde Pública da Califórnia. Em 17 de abril o CDC identificou o novo vírus na amostra da menina de nove anos e notificou o achado a OMS segundo a aplicação do novo Regulamento Sanitário Internacional de 2005 (RSI 2005). Em 21 de abril o CDC/EUA solicitou o início dos planos de preparação para uma pandemia de gripe por autoridades de saúde pública. No dia 23 de abril a Agência de Saúde Pública do Canadá também detectou o vírus H1N1 pandêmico em espécimes recebidos do México. O aumento de casos e a descoberta que os casos do México e da Califórnia eram causados pelo mesmo vírus desencadeou alerta pelo CDC e OMS em 24 de abril.

Em 25 de abril de 2009, a OMS declarou a Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII). No dia 27 de abril, diante da propagação internacional e dos focos de transmissão de humano para humano, a OMS mudou o alerta de pandemia da fase 3 para a fase 4, e logo em seguida para a fase 5, indicando a propagação de humano para humano em no mínimo dois países, e sinais de pandemia iminente. 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, no nível comunitário, em diferentes regiões do mundo (BRASIL, 2010c; DAWOOD et al., 2009; NEUMANN et al., 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009).

No cenário brasileiro, em 24 de abril de 2009, um dia antes da declaração pública, a OMS comunicou ao Ministério da Saúde (MS) que no dia seguinte iria declarar a ESPII. Em 7 de maio, foram divulgados os primeiros resultados laboratoriais realizados pelos Laboratórios da Fiocruz/RJ e Instituto Adolfo Lutz/SP.

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, todos ficaram curados.

No Brasil, a pandemia foi dividida em duas fases epidemiológicas e operacionais distintas: 1) Fase de contenção – período em que o vírus estava se disseminando no mundo e os casos estavam relacionados às viagens internacionais ou contato com pessoas doentes que tinham realizado viagens internacionais. Nesta fase, as ações de vigilância e resposta buscavam reduzir a disseminação do vírus no país, visando proteger a população e instrumentalizar o 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; 2) Fase de mitigação – Essa compreendeu o período desde a SE 29, após declaração de transmissão sustentada do vírus *Influenza* pandêmico em todo o território nacional. As ações recomendadas para esta fase visavam reduzir a gravidade e mortalidade pela doença, por meio do diagnóstico e tratamento dos casos que apresentavam risco para doença grave ou óbito, ou que apresentassem algum sinal de agravamento (BRASIL, 2010a).

Segundo a OMS, do início da pandemia ao final do ano epidemiológico de 2009, em 2 de janeiro de 2010, houve notificação de circulação do vírus pandêmico em 208 países, territórios ou comunidades. Em 2009, foram notificados 12.799 óbitos confirmados laboratorialmente em todo mundo. No Brasil, na fase de contenção, foram registrados 12.919 casos de SG e síndrome respiratória aguda grave (SRAG), desses, 4.434 casos foram confirmados por critério laboratorial ou clínicoepidemiológico, 35% (1.556) apresentaram quadro clínico de SRAG, definida por febre, tosse e dispnéia. Destes, 14,5% (227/1.556) evoluíram para óbito. Se considerarmos o total de casos confirmados por SG e SRAG, a taxa de letalidade foi de 5,1% (227/4.434) para o período. Na fase de mitigação, visando atenuar a ocorrência de casos graves e óbitos pela doença, adotou-se o monitoramento de casos de SRAG, definidos por febre, tosse e dificuldade respiratória,

independentemente da história de viagem internacional, além dos óbitos. Nessa fase foram confirmados 44.544 casos (tabela 1) (BRASIL, 2010b).

Tabela 1: Distribuição dos casos de *Influenza* pandêmica (H1N1) 2009 por região geográfica. Brasil, SE 16 a 52/2009.

<i>Região</i>	<i>Nº de Casos Notificados</i>	<i>Confirmados para H1N1 pdm</i>	<i>Óbitos Confirmados para H1N1 pdm</i>	<i>Taxa de Mortalidade (100 mil hab.)</i>
Sudeste	38.052	13.951	973	1,1
Sul	53.243	32.481	840	3,0
Nordeste	3.844	820	57	0,1
Centro-Oeste	2.734	955	138	1,0
Norte	2.217	771	43	0,3
Brasil	100.090	48.978	2.051	1,1

Fonte: Brasil, Boletim Eletrônico Epidemiológico, 2010.

No ano de 2010, até 05 de setembro, período que compreende as SE de 1 a 35, foram notificados 9.317 casos, destes 773 foram confirmados e 99 foram a óbito (tabela 2). Em 10 de agosto de 2010, a OMS anunciou o início da fase pós-pandêmica da gripe (H1N1) 2009. Isso significa que o vírus continua circulando no mundo, mas junto com outros vírus sazonais (da gripe comum) e em intensidade diferente entre os países. Essas evidências contribuíram para a decisão de mudar o nível de alerta para fase pós-pandêmica (figura 2) (BRASIL, 2010b).

Tabela 2: Distribuição dos casos de *Influenza* pandêmica (H1N1) 2009 por região geográfica. Brasil, SE 1 a 35/2010.

<i>Região</i>	<i>Nº de Casos Notificados</i>	<i>Confirmados para H1N1 pdm</i>	<i>Óbitos Confirmados para H1N1 pdm</i>
Sudeste	4.461	91	15
Sul	2.425	307	19
Nordeste	703	103	17
Centro-Oeste	569	16	4
Norte	1.159	256	44
Brasil	9.317	773	99

Fonte: Brasil, Informe Técnico Epidemiológico, 2010.

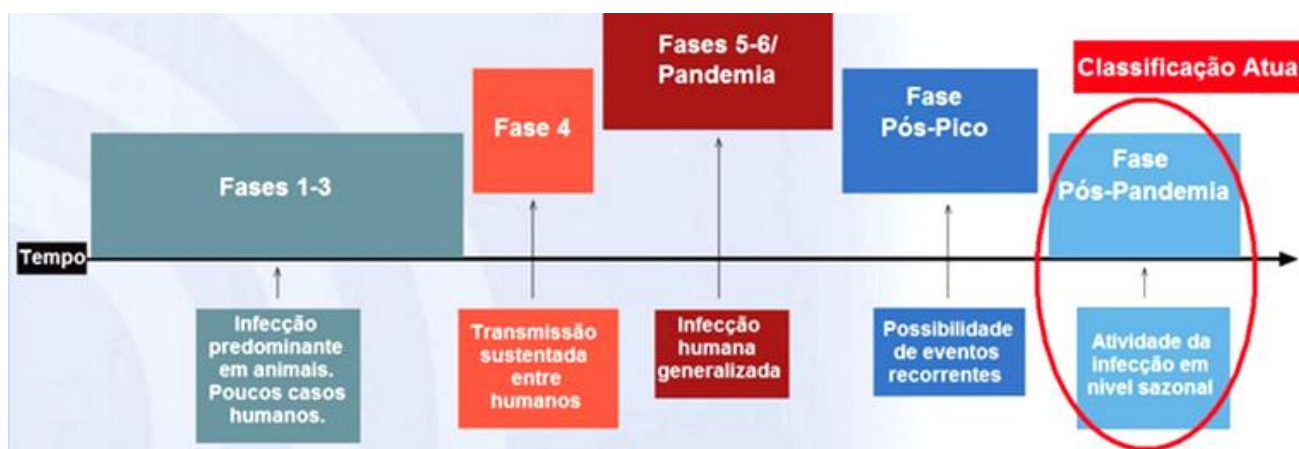


Figura 2: Fases pandêmicas.
Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, 2010.

4.2. O VÍRUS INFLUENZA

4.2.1. Classificação

Os vírus *Influenza* acometem homens ou animais e estão classificados na família *Orthomyxoviridae* (*orthos* – original, verdadeiro; *myxa* – muco) que apresenta cinco gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogovirus* e *Isavirus* (ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012). O gênero *Thogovirus* contém duas espécies o vírus *Dhori* o vírus *Thogoto*, que acometem carrapatos (HAGMAIER et al., 2003), e *Isavirus* que contém a espécie viral da anemia infecciosa do salmão (*Infectious salmon anemia virus* - ISA). Desses, somente os gêneros A, B e C apresentam relevância clínica em humanos, sendo que o vírus do tipo A infecta uma grande variedade de hospedeiros, como o homem, mamíferos aquáticos, suínos, eqüinos e aves domésticas, tendo como seu reservatório natural as aves aquáticas selvagens.

Segundo a espécie molecular das duas glicoproteínas de superfície viral, a hemaglutinina e a neuraminidase. Os vírus de tipo A são divididos em subtipos sorológicos (H3N2, H1N1) (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; PALESE E SHAW, 2007; TAUBENBERG E MORENS, 2008; VÉLEZ, 2002; WEBSTER et al., 1991).

Atualmente são conhecidos 17 tipos de hemaglutinina (H1-H17) e nove tipos de neuraminidase (N1-N9), os tipos H1 a H16 e todos os tipos de neuraminidase são encontrados em vírus aviários, a H17 foi descrita recentemente em morcegos. Apenas três tipos de hemaglutinina (H1, H2 e H3) e dois tipos de neuraminidase (N1 e N2) estão adaptadas para infectar seres humanos (TONG et al., 2012; VÉLEZ, 2002; ZAMBON, 2001).

Para a nomenclatura do vírus da gripe são adotadas as normas da OMS que inclui o tipo de vírus (A, B ou C), o hospedeiro original (exceto para humanos), a localização geográfica do primeiro isolamento, o número do registro laboratorial, o ano de isolamento e para, *Influenza A*, é especificado entre parênteses a descrição antigênica da hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) como: *A/swine/lowa/15/30* (H1N1) ou *A/Brasil/2/78* (H3N2) (TAUBENBERG E MORENS, 2008).

4.2.2. Estrutura das partículas virais e organização genômica

As partículas virais são pleomórficas, porém, quando adaptadas em culturas de células, são geralmente esféricas com um diâmetro de 80-120 nm, ou apresentam característica filamentosa, encontrada principalmente em amostras clínicas, com comprimento de aproximadamente 300 nm (figura 3). São compostas de 1% de RNA, 5 a 8% de carboidratos, 20% de lipídios e aproximadamente 70% de proteína. Por sua própria composição química os vírus *Influenza* são sensíveis ao calor (56°C – 30 minutos), pH ácido (3,0) e solventes lipídicos (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

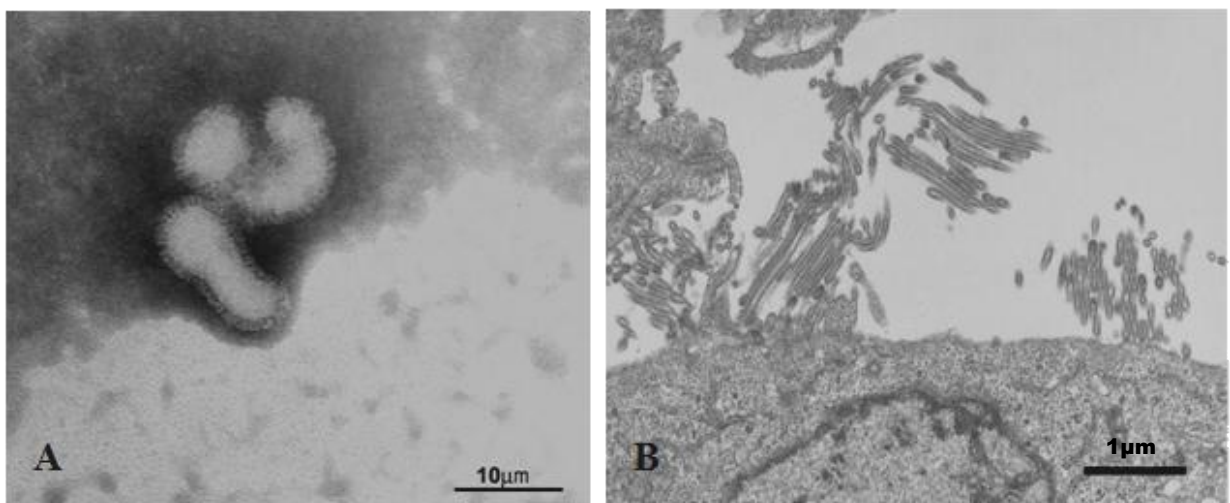


Figura 3: Microscopia eletrônica do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm isolados de cultura de célula de rim de cães (MDCK). **A)** Forma aproximadamente esférica. **B)** Partículas virais com forma filamentosa com mais de 1 µm de comprimento.

Fonte: A) Laboratório de Vírus Respiratórios e Microscopia Eletrônica, Instituto Evanbro Chagas. B) Neumann et al., 2009.

Os vírus *Influenza A* apresentam uma estrutura complexa e possuem uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira. Nessa camada estão inseridas as glicoproteínas de superfície viral: HA (trimérica), NA (tetramérica) e o canal de prótons M2 que atravessa o envelope lipídico (figura 4). A HA e a NA estão distribuídas na superfície viral em uma proporção de quatro HA para uma NA (BOUVIER E PALESE, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

A proteína de matriz M1 encontra-se logo abaixo da membrana lipídica, envolvendo o core viral. A proteína M1 envolve a proteína de exportação nuclear (NEP; também conhecida como proteína não-estrutural 2, NS2), e o complexo ribonucleoproteico (RNP), que consiste de segmentos de RNA viral revestidos pela nucleoproteína NP e complexo composto por duas polimerases virais básicas – polimerase básica 1 (PB1) e polimerase básica 2 (PB2) – e uma polimerase viral ácida (PA) que estão situadas na extremidade do nucleocapsídeo (figura 4). A NS1 é encontrada somente nas células infectadas. Esta proteína atua na regulação da expressão dos genes virais (BOUVIER E PALESE, 2008; LEWIS, 2006; PALESE E SHAW, 2007; WEBSTER et al., 1992).

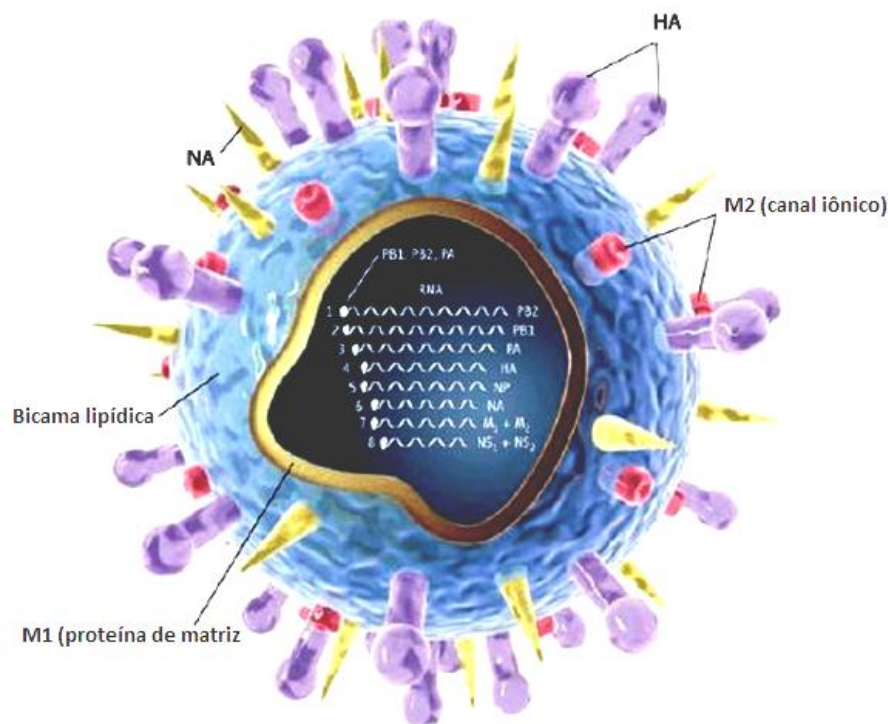


Figura 4: Representação esquemática da partícula viral do vírus *Influenza A*.
Fonte: Sullivan et al., 2010.

Cada partícula viral individual empacota os oito segmentos de RNA e precisa dos oito segmentos para ser infecciosa (NODA et al., 2006; WEBSTER et al., 1992).

A maior parte dos vírus *Influenza B* é indistinguível dos vírus *Influenza A* por microscopia eletrônica. Sua organização genômica é similar ao vírus *Influenza A*, esses vírus apresentam quatro proteínas inseridas no envelope lipídico: HA, NA, NB e BM2. A proteína M1 e o complexo RNP estão no interior da partícula viral. Já a estrutura do vírus *Influenza C* é distinta dos *Influenza A* e B, eles podem formar, na superfície das células infectadas, longas estruturas em forma de cordão que medem aproximadamente 500 µM. Esses vírus têm apenas uma glicoproteína de superfície a hemaglutinina-esterase-fusão (HEF), que corresponde funcionalmente a HA e NA dos vírus *Influenza A* e B, essa glicoproteína está inserida na membrana lipídica juntamente com a CM2. Os vírus *Influenza C* também possuem um complexo com as três polimerases virais e a proteína NP. A proteína M1 desempenha um papel semelhante àquela dos *Influenza A* e B (BOUVIER E PALESE, 2008; PALESE E SHAW, 2007;).

O genoma dos vírus *Influenza A* e B possuem oito segmentos de RNA de fita simples e polaridade negativa, enquanto que o vírus *Influenza C* possui apenas sete segmentos.

Os oito segmentos do *Influenza A* são numerados em ordem decrescente de comprimento e juntos codificam 11 proteínas. Os três primeiros segmentos codificam as polimerases (PB2, PB1, PA, PB1-F2), o quarto, o quinto e o sexto codificam respectivamente para HA, NP e NA. O sétimo segmento codifica para M1 e M2 e o oitavo para as proteínas NS1 e NS2/NEP (figura 5) (BOUVIER E PALESE, 2008; COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

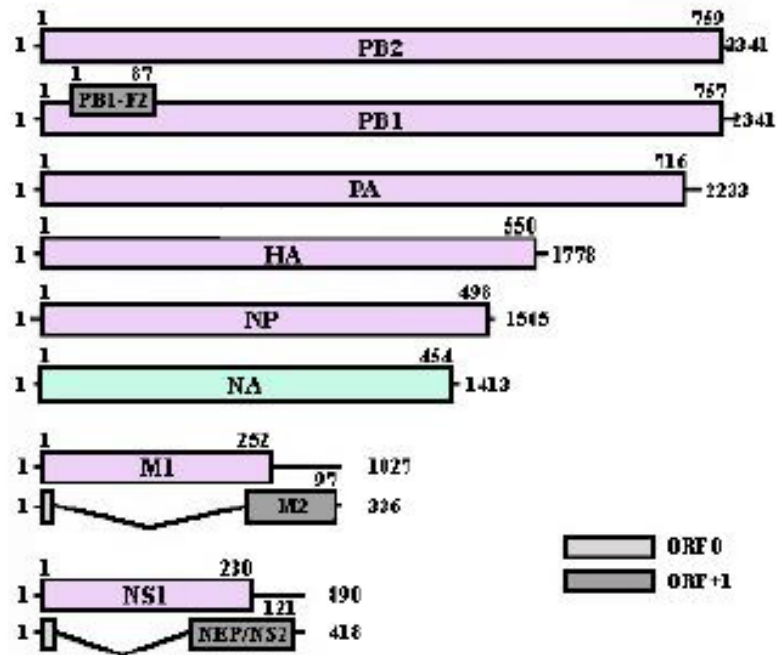


Figura 5: Esquema representativo do genoma do vírus *Influenza A*. Cada um dos retângulos representa um segmento de RNA (sentido positivo) e sua proteína codificada. Os tamanhos, em nucleotídeos e em aminoácidos (aa), respectivamente, estão representados pelos algarismos localizados nas extremidades.

Fonte: Fildes Virology, capítulo 47, 2007.

No quadro 1 encontram-se descritos todos os segmentos do vírus *Influenza A* com suas funções e seus tamanhos em nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa).

QUADRO 1 - Produtos gênicos codificados pelos segmentos de RNA do vírus *Influenza A*.

	Proteína codificada	Tamanho (nt)	Tamanho (aa)	Função
Segmento 1	PB2	2341	759	Compõe a RNA polimerase viral, importante papel no início da transcrição, pois é responsável pela ligação <i>cap</i> nas moléculas de RNAm do hospedeiro. Também está envolvida na replicação.
Segmento 2	PB1	2341	757	Compõe a RNA polimerase viral, catalisa a adição sequencial de nucleotídeos durante o alongamento da cadeia de RNA. É responsável pela ligação nas extremidades terminais do RNA viral e do RNA complementar para iniciar a transcrição e a replicação. A interação com o final 3' do RNA viral ativa a função de endonuclease que gera o <i>primer</i> com <i>cap</i> requerido para a síntese do RNAm.
	PB1-F2		87	É encontrada na maioria dos <i>Influenza A</i> , é gerada devido a um quadro de leitura aberto alternativo localizado na extremidade 5' da PB1. Seu papel não está completamente compreendido, mas parece causar destruição de células imunes do hospedeiro.
Segmento 3	PA	2233	716	Compõe a RNA polimerase viral. Nenhuma função específica foi atribuída a essa proteína até o momento, mas mutações que afetam tanto a transcrição como a replicação têm sido descritas, indicando que essa proteína possui um papel nesses processos.
Segmento 4	HA	1778	550	É responsável pela ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira e pela fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira.
Segmento 5	NP	1565	498	Ligação do RNA viral e formação do nucleocapsídeo, também atua na transcrição e replicação do genoma viral.
Segmento 6	NA	1413	454	É responsável pela clivagem do ácido siálico dos receptores celulares, previne que os novos vírus formados liguem-se uns aos outros, permitindo que esses vírus infectem novas células.
Segmento 7	M1	1027	252	Forma um escudo em volta do nucleocapsídeo e tem um papel fundamental na montagem e brotamento viral.
	M2		97	Seu principal papel é conduzir prótons do endossomo acidificado para o interior do vírus para facilitar a dissociação do complexo RNP do restante dos componentes virais, finalizando o processo de desencapsulamento durante a replicação viral.
Segmento 8	NS1	890	230	É abundante em células infectadas, está associada ao processo de tradução do RNAm, inibindo a exportação nuclear do RNAm.
	NS2/NEP		121	Está envolvida na exportação do RNA viral para o citoplasma.

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

4.2.3. Replicação viral

Os vírus *Influenza* ligam-se a célula hospedeira através da HA que reconhece os receptores de ácido siálico presentes na superfície da célula. Os ácidos siálicos (*N*-acetilneuramínico) estão presentes em muitos tipos de células e em várias espécies de animais. A interação desses vírus com a molécula de ácido siálico é limitada, pois as HA, de vírus que replicam em diferentes espécies, mostram especificidade com os ácidos siálicos com diferentes ligações (BASLER E AGUIAR, 2008; BOUVIER E PALESE, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

Os vírus *Influenza* humanos ligam-se, preferencialmente, aos receptores onde o ácido siálico (AS) se liga a galactose subjacente através da ligação α 2,6 (AS α 2,6Gal), enquanto que os vírus *Influenza* aviários reconhecem, preferencialmente, os receptores AS α 2,3Gal. A ligação AS α 2,6Gal predomina nas células epiteliais da mucosa nasal humana, faringe, traquéia e brônquios. Já o epitélio intestinal de aves aquáticas possui essencialmente a ligação α 2,3. Contudo, estudos mostraram que receptores do tipo aviário podem estar presentes em células epiteliais humanas que revestem os bronquíolos respiratórios e as paredes alveolares. O epitélio respiratório de suínos apresenta especificidade para ambos os receptores. Deve-se observar que essa especificidade não é absoluta, vírus aviários e humanos podem sofrer mutações e se adaptar para ambas as ligações (figura 6) (BASLER E AGUIAR, 2008; BOUVIER E PALESE, 2008; LEWIS, 2006; NEUMANN E KAWAOKA, 2006).

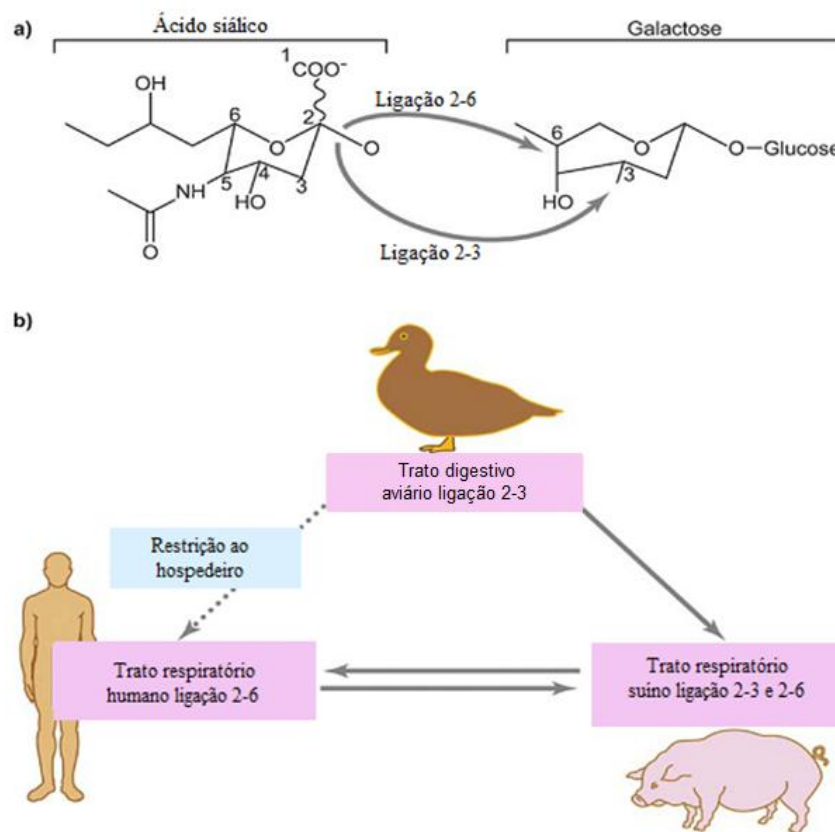


FIGURA 6: a) Resíduos de ácido siálico ligados a galactose através das ligações SAα2,6Gal e SAα2,3Gal. b) Especificidade de ligação entre as espécies.
Fonte: Lewis, 2006.

A ligação da HA aos ácidos siálicos induz a entrada do vírus na célula por endocitose, formando um endossoma. Os endossomas sofrem acidificação no citoplasma (através da diminuição do pH, igual a 5.0) o que provoca a clivagem da HA em duas subunidades HA1 e HA2 (uma exigência para a infectividade e virulência viral). Tal clivagem determina uma mudança conformacional na HA que expõe o peptídeo de fusão da subunidade HA2, propiciando, dessa forma, a fusão das membranas viral e endossomal (BOUVIER E PALESE, 2008; LEWIS, 2006).

A acidificação do endossoma ativa também o canal de prótons (proteína M2), que transporta íons H^+ para o interior da partícula viral desestabilizando a proteína M1, facilitando assim, a liberação dos RNPs virais (RNPsv) para o citoplasma da célula hospedeira. Os segmentos da partícula viral são transportados para o núcleo da célula onde o RNA viral (RNAv), de sentido negativo, é transcrito em RNA mensageiro (RNAm) por um mecanismo *primer*-dependente, com o auxílio dos *cap* do RNAm do hospedeiro, que funciona como um iniciador (*primer*). Os RNAm formados são transportados para o citoplasma para que ocorra o processo de

tradução (BASLER E AGUIAR, 2008; BOUVIER E PALESE, 2008; PALESE E SHAW, 2007).

Cada segmento viral codifica uma proteína, porém os RNAm dos segmentos dois, sete e oito podem sofrer *splicing* durante a transcrição e codificar duas proteínas, PB1 e PB1-F2, M1 e M2, e NS1 e NS2, respectivamente. A tradução dos RNAm que codificam as proteínas de membrana (HA, NA e M2) é feita nos ribossomos do retículo endoplasmático (RE) e as mesmas são glicosiladas no Complexo de Golgi, os demais são traduzidos nos ribossomos citoplasmáticos.

A síntese de RNAv é realizada pelo complexo de polimerases virais (PB1, PB2, PA e NP) porém, as funções distintas de cada subunidade são empregadas em diferentes passos. Na replicação, que também ocorre no núcleo e não depende de iniciadores, o RNA viral de sentido negativo serve como molde para a síntese do RNA complementar de polaridade positiva que, por sua vez, é usado como molde para a síntese do RNA viral genômico de fita negativa e, em seguida, síntese das RNPsv. As RNPsv neoformadas são exportadas para o citoplasma com a ajuda das proteínas M1 e NEP/NS2.

Finalmente, as proteínas de membrana (HA, NA e M2), de matriz (M1) e as RNPsv (contendo o RNAv de fita negativa e as proteínas NP, as três polimerases e a NEP/NS2) são transportadas para o local de montagem na membrana plasmática, onde as partículas virais são construídas e liberadas para o exterior da célula. O mecanismo de empacotamento ainda não está bem compreendido e a liberação das partículas virais é facilitada pela NA que remove os ácidos siálicos da superfície da partícula viral e da célula hospedeira, evitando que as partículas virais se agregem (BASLER E AGUIAR, 2008; BOUVIER E PALESE, 2008; PALESE E SHAW, 2007; ZHANG et al., 2009). A figura 7 ilustra o ciclo de replicação dos vírus *Influenza*.

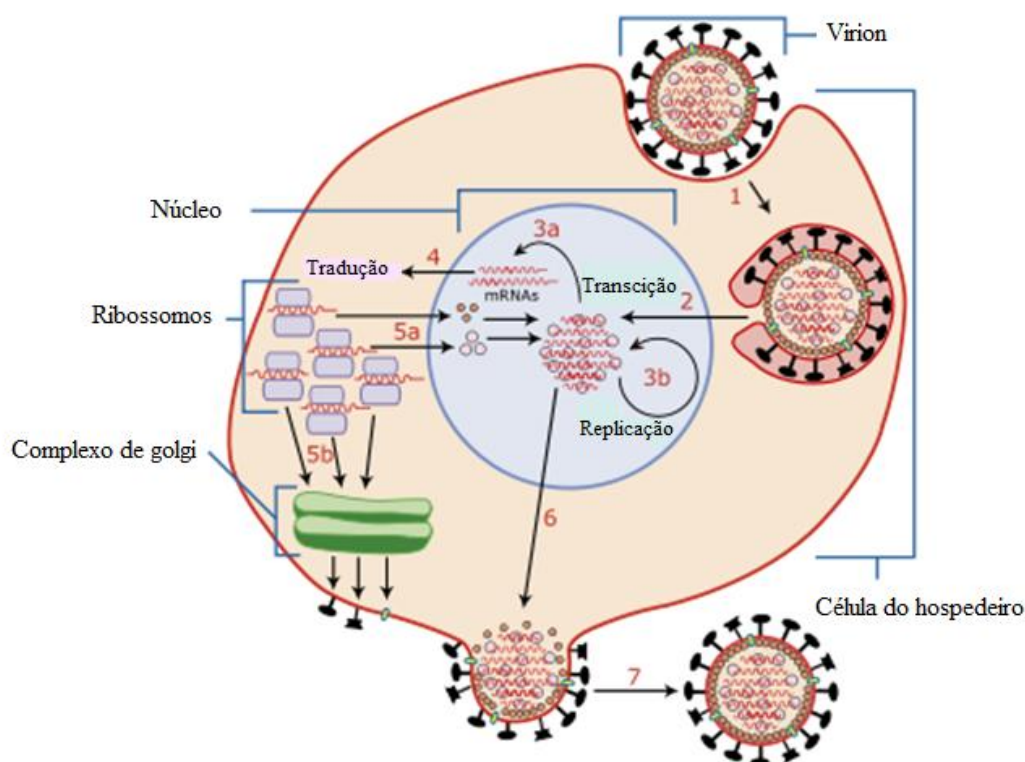


FIGURA 7: Representação do ciclo replicativo do vírus *Influenza*.
 Fonte: <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Influenza>.

4.2.4. Variação antigênica

A epidemiologia dos vírus *Influenza* é definida pela constante variação antigênica que estes vírus apresentam em suas proteínas de superfície, para escapar da resposta imunológica do hospedeiro. Em contraste com a maioria dos outros vírus respiratórios, os vírus *Influenza* possuem dois mecanismos diferentes que permitem a reinfecção em humanos e a capacidade de causarem epidemias sazonais e ocasionalmente pandemias: os *drift* e o *shift* antigênicos (WRIGHT et al., 2007).

Os *drifts* antigênicos (mudanças menores) resultam de mutações pontuais (principalmente substituições aminoacídicas) nos vírus *Influenza* A e B. Referem-se a uma mudança menor e gradual nas proteínas HA e NA permitindo, muitas vezes, o escape viral aos anticorpos neutralizantes (figura 8). O *drift* antigênico tem sido observado em aves aquáticas, porém, em menor grau do que em humanos. Variações genéticas significativas ocorrem, em média, de 2 a 5 anos, causando epidemias anuais (LEWIS, 2006; SULLIVAN et al., 2010; WRIGHT et al., 2007).

Os *shifts* antigênicos (mudanças maiores) são facilitados pela natureza segmentada desses vírus. Trata-se de variações geradas pelo rearranjo entre os diversos segmentos do genoma viral quando duas ou mais cepas, de diferentes espécies, infectam a mesma célula. Esse mecanismo pode facilitar o surgimento de novos vírus contendo glicoproteínas diferentes, sendo, portanto, imunogeneticamente diferentes das cepas circulantes (figura 8). Dessa forma, a maioria da população não tem imunidade para esses novos vírus e a doença dissemina-se rapidamente causando pandemias (MC-HARDY E ADAMS, 2009 ; SULLIVAN et al., 2010; WRIGHT et al., 2007).

Durante o século passado, três *shifts* antigênicos ocorreram causando as três pandemias: em 1918, com o aparecimento do vírus H1N1 que causou a gripe espanhola; em 1957, quando o subtipo H1N1 foi substituído pelo vírus H2N2 causando a gripe asiática, e em 1968, quando o vírus H3N2 substituiu o subtipo H2N2 causando a gripe de Hong Kong. Outro mecanismo relacionado ao surgimento de uma nova linhagem pandêmica é a transmissão direta de vírus *Influenza* aviário ou suíno para o homem, como ocorreu com a gripe espanhola e com o vírus (H1N1)pdm em 2009 (WRIGHT et al., 2007).

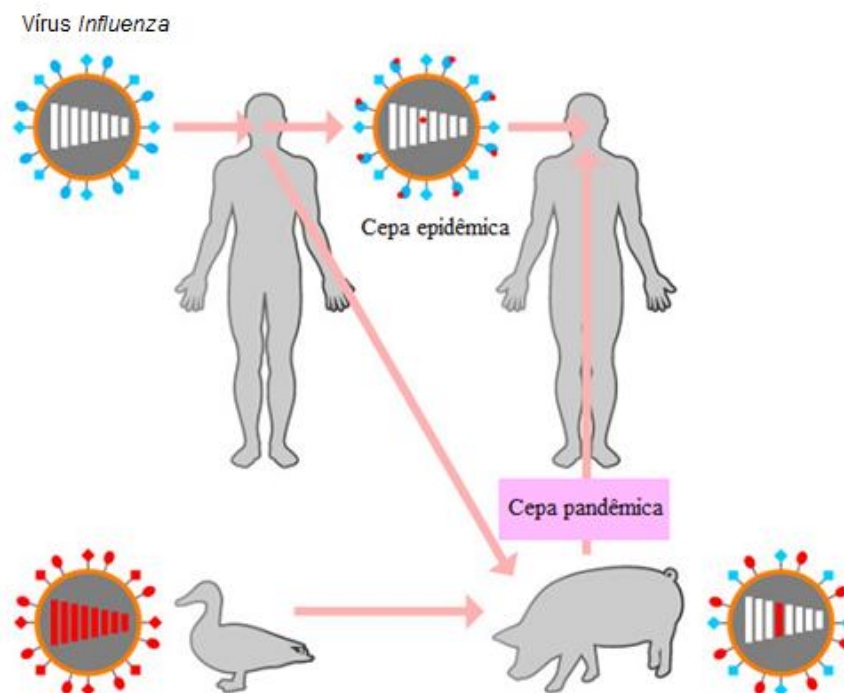


FIGURA 8: Mutações e rearranjos gerados por *drifts* e *shifts* antigênicos.
Fonte: Turner et al., 2010.

4.2.5. *Influenza* em aves e suínos

O reservatório natural dos vírus *Influenza A* é da ordem dos *Anseriformes* (pato, ganso e cisne) e *Charadriiformes* (gaivotas, andorinhas, aves aquáticas e maçaricos). O vírus *Influenza A* também tem sido isolado de espécies domésticas como peru, galinha e pato. Os sinais da infecção por vírus *Influenza* em aves variam de acordo com a cepa, a maioria causa infecção assintomática, no entanto, algumas podem causar infecção sistêmica e levar a morte em uma semana. A natureza não virulenta do vírus da gripe nas aves pode ser resultado de uma ótima adaptação do vírus nesses hospedeiros (WRIGHT et al., 2007).

Em patos selvagens os vírus da gripe se replicam, preferencialmente, nas células que revestem a mucosa intestinal, onde estão presentes receptores (ácidos siálicos) do tipo $\alpha 2,3$, e são excretados em altas concentrações nas fezes. A contaminação da água pelas aves aquáticas migratórias é uma das principais causas da eficiente transmissão do vírus entre essas espécies, criando um reservatório que garante a perpetuação do vírus. O *drift* antigênico é limitado em aves aquáticas, porém, ocorre com mais frequência em aves domésticas, como aconteceu com o vírus H5N1 na Ásia que foi transmitido para humanos (WEBSTER et al., 1992; WRIGHT et al., 2007).

O papel dos suínos na epidemiologia do vírus *Influenza* tem sido bem descrito. Os sintomas da gripe nesses animais são semelhantes aos que ocorrem em humanos, com febre, tosse e coriza. Uma série de achados sugere que os suínos têm um papel importante na emergência de pandemias pelo vírus *Influenza*: suínos podem ser naturalmente e experimentalmente infectados por vírus aviários e expressarem, nas células epiteliais da traquéia, tanto receptores para vírus *Influenza* de origem aviária ($\alpha 2,3$) como para vírus de origem humana ($\alpha 2,6$). Assim, *in natura* os suínos podem favorecer a replicação de vírus aviário. Isso pode facilitar o surgimento de variantes que reconheçam receptores do tipo humano, apoiando o conceito de que em suínos há grande probabilidade de “mistura” entre os segmentos genéticos de vírus humano e aviário (BROOKES et al., 2010; WRIGHT et al., 2007; YU et al., 2009).

Ao longo dos anos, linhagens exclusivamente suínas se estabeleceram em alguns continentes. O vírus H1N1 suíno clássico dominou por aproximadamente seis décadas em populações suínas na América do Norte. Contudo, em 1997-1998,

o vírus H3N2 de rearranjo triplo humano/aviário/suíno surgiu com ampla propagação em populações de porcos na América do Norte e foi um dos progenitores do vírus *Influenza A* (H1N1) pdm (NEUMANN et al., 2009).

4.2.6. Neuraminidase

A neuraminidase (NA) é a segunda glicoproteína de superfície mais abundante dos vírus *Influenza A* e B. É um tetrâmero, com formato de cogumelo, codificada pelo sexto segmento do RNA viral. A NA é uma proteína de membrana integral do tipo II, com a porção N-terminal voltada para o interior do vírus. A NA dos vírus *Influenza A* tem uma curta cauda citoplasmática altamente conservada e uma região transmembrânica hidrofóbica que fornece a âncora para a cauda e os domínios da cabeça. Os resíduos de açúcar estão ligados a quatro dos cinco sítios potenciais de glicosilação da cabeça. O sítio ativo encontra-se em uma grande depressão na superfície da cabeça e é altamente conservado (figura 9), o que permite uma atividade de amplo espectro dos inibidores da NA (GUBAREVA et al., 2000; PALESE E SHAW, 2007).

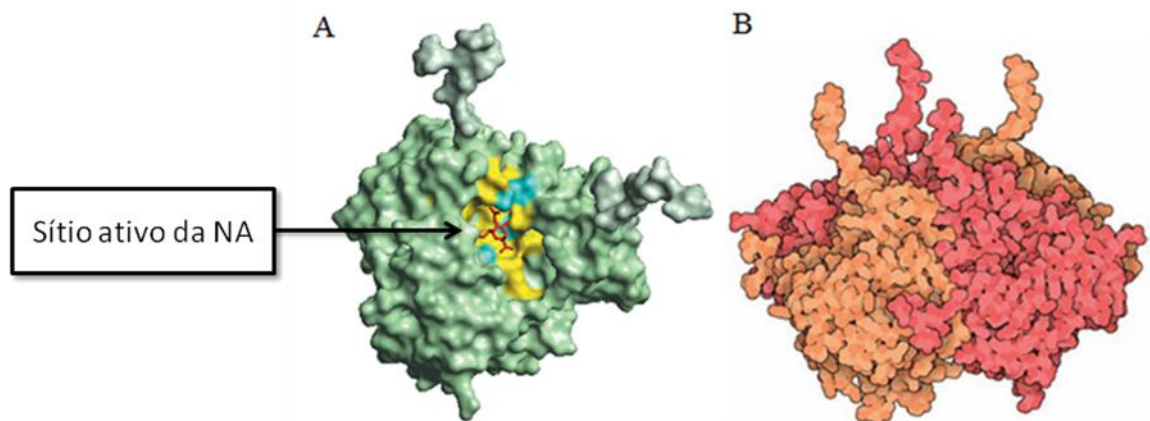


FIGURA 9: Representação da estrutura da neuraminidase do vírus *Influenza A*.
Fonte: A) Gubareva, 2000 e B) Protein data Bank, 2009.

A existência de uma atividade enzimática da NA foi descoberta por George Hirst em 1942, ele incubou células infectadas e observou a reação de hemaglutinação, depois de algum tempo verificou que a reação era inibida. Então Hirst concluiu que uma das glicoproteínas de superfície (a HA) se ligava a célula

através do ácido siálico e que a outra glicoproteína (a NA) clivava o ácido siálico liberando o vírus (COLMAN, 1994).

A NA é responsável pela clivagem do ácido siálico dos receptores celulares e das partículas virais recém-formadas, sendo de extrema importância para a infecção viral, pois permite que os novos vírus formados consigam infectar novas células, prevenindo que estes vírus liguem-se uns aos outros. Tal processo assegura que as partículas virais neoformadas não se agreguem e fiquem imobilizadas na superfície das células infectadas (figura 10). A NA também cliva o ácido siálico da camada de muco, o que provavelmente permite que o vírus chegue à superfície das células epiteliais. A NA pode desempenhar um papel no início da infecção facilitando a entrada do vírus (GUBAREVA et al., 2000; NEUMANN E KAWAOKA, 2006; PALESE E SHAW, 2007).

Assim como a HA tem preferência por determinado tipo de ligação ($\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$) para ligar-se aos receptores celulares dos diferentes tipos de hospedeiros, a NA também têm preferência para clivar a ligação $AS\alpha 2,3Gal$ em vírus aviário e $AS\alpha 2,6Gal$ em vírus humano. Para que a NA possa agir efetivamente, a mesma deve compartilhar a especificidade da HA. A especificidade da NA para clivar a ligações de ácido siálico pode ser influenciada por substituições aminoacídicas em torno do seu sítio ativo. Como a HA, as moléculas de NA são antigênicas, e variantes são selecionadas na natureza. Junto com a HA, são importantes imunógenos, sendo que a proteção contra o vírus *Influenza* está intimamente relacionada aos níveis de anticorpos anti-HA e anti-NA (PALESE E SHAW, 2007; WRIGHT et al., 2007; ZAMBON, 2001).

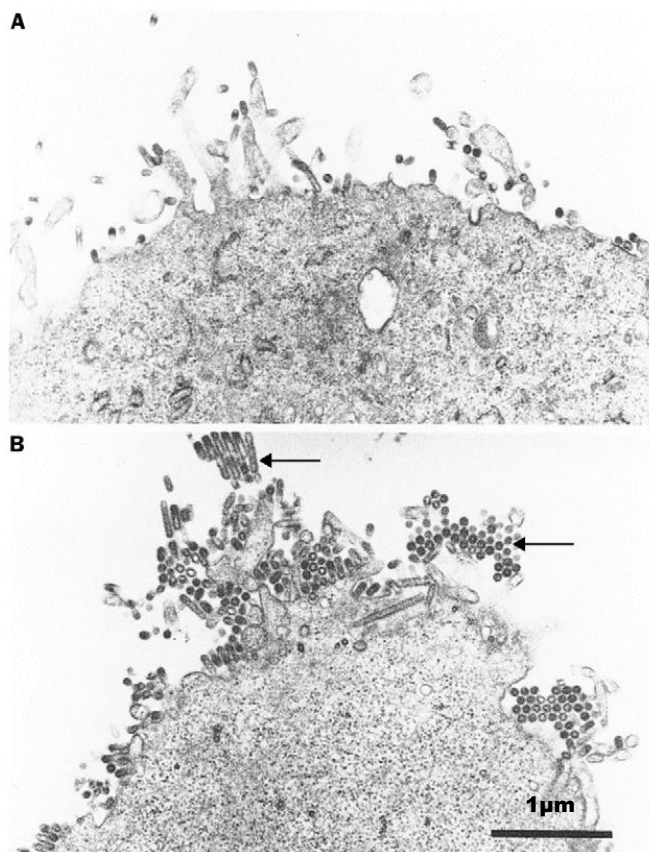


FIGURA 10: Microscopia eletrônica de células MDCK infectadas com o vírus *Influenza*. **A)** Brotamento normal de novos vírus na ausência de inibidores da NA. **B)** Agregação de partículas virais recém formadas na presença de inibidor da NA. Fonte: Gubareva, 2000.

4.3. O VÍRUS INFLUENZA A (H1N1) PANDÊMICO

4.3.1. A origem genética

O vírus *Influenza* A (H1N1) pdm possui uma combinação de segmentos nunca descrita anteriormente. Este vírus foi gerado por um rearranjo genético múltiplo, em que cada um dos seus segmentos já circulava entre suínos nos últimos 10 anos (GARTEN et al., 2009; VIJAYKRISHNA et al., 2010).

Dados sobre a composição genética do vírus tornaram-se disponíveis logo após o isolamento viral dos primeiros casos. O vírus H1N1 de origem suína resultou do rearranjo entre os vírus H3N2 humano, H1N1 suíno clássico norte americano e H1N1 aviário norte americano (ou seja, rearranjo triplo aviário/suíno/humano) com

vírus suínos similares aos aviários da Eurásia. Como resultado, esses vírus possuem genes PB2 e PA originais de vírus aviários da América do Norte; gene PB1 do H3N2 humano; genes HA (H1), NP e NS de vírus suínos clássicos norte americano; e genes NA (N1) e M originais de vírus suínos similares aos da Eurásia (figura 11). Contudo, os genes PB1 (tipo humano), PB2 e PA (tipo aviário) têm circulado em suínos desde 1997-1998, quando um vírus suíno de rearranjo triplo foi isolado pela primeira vez (NEUMANN et al., 2009; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009; SMITH et al., 2009).

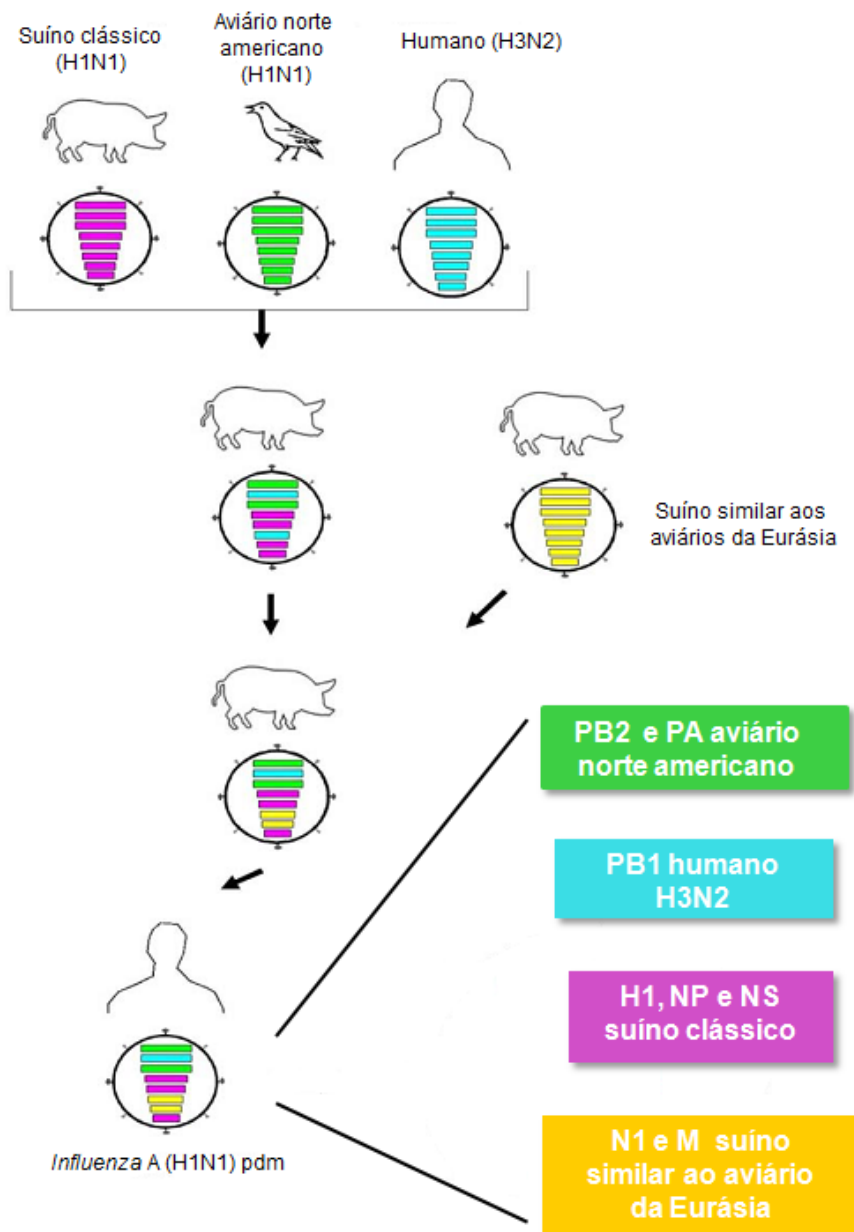


FIGURA 11: Origem genética do vírus *Influenza A (H1N1) pdm 2009*.
Fonte: Adaptado de Schnitzler e Schnitzler, 2009.

4.3.2. Transmissão e sintomatologia

A transmissão do vírus *Influenza* é inter-humana e o modo de transmissão pode ser direto – mais comum – de pessoa a pessoa, por inalação de gotículas de aerossol eliminadas pelo indivíduo infectado ao tossir, espirrar e falar; e indireto, pelo contato – especialmente pelas mãos – com as secreções infectadas. O período de incubação varia de 1 a 4 dias, e um único indivíduo contaminado pode potencialmente transmitir o vírus para um grande número de pessoas. Os adultos começam a transmitir o vírus 24 horas antes do início dos sintomas, até sete dias após. As crianças podem transmitir o vírus por um período mais prolongado, de 1 a 2 dias antes, até 14 dias após o início da sintomatologia. O vírus pode continuar a ser eliminado com potencial de infectividade por semanas em pessoas imunodeprimidas (BRASIL, 2009; SULLIVAN et al., 2009).

A eficiência da transmissão do vírus *Influenza A (H1N1) pdm* difere da gripe sazonal, pois o fator chave para a difusão rápida e global do vírus em 2009 foi a grande quantidade de indivíduos suscetíveis, ou seja, a maioria da população humana tinha pouca ou nenhuma imunidade pré-existente ao vírus. Dessa forma, a pandemia afetou principalmente crianças e adultos jovens, sendo que pessoas mais velhas poderiam apresentar uma possível imunidade (MOSSAD, 2009; TURNER et al., 2010).

Os sintomas mais frequentes da gripe são caracterizados por febre (38° a 40°C), cefaléia, dor de garganta, mialgia, congestão nasal, tosse, calafrios, mal-estar e fadiga. Durante a pandemia de 2009 a maioria dos casos foi classificada como leve com sintomas semelhantes aos da gripe sazonal. Alguns pacientes apresentaram sintomas gastrintestinais pouco comuns nos surtos sazonais de gripe como náuseas, dor abdominal e diarreia. Muitos pacientes foram hospitalizados, e doentes que apresentavam comorbidades eram mais propensos a internação. Os casos mais graves eram encaminhados a unidade de terapia intensiva (UTI) e apresentavam síndrome respiratória aguda grave (SRAG) caracterizada pela presença de febre acima de 38°C, tosse e dispnéia com comprometimento das vias aéreas inferiores e acompanhados de outras complicações como, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência respiratória, infecção bacteriana secundária, sepse, insuficiência renal, disfunção de múltiplos órgãos, miocardite, encefalite e

agravamento de doenças crônicas subjacentes, como doenças pulmonares ou cardíacas (BRASIL, 2009; MOSSAD, 2009; SULLIVAN et al., 2009).

Os fatores de risco que poderiam contribuir para o agravamento da infecção pelo vírus *Influenza A (H1N1) pdm* estavam associados aos seguintes grupos: pessoas que apresentavam condições clínicas como imunodepressão, por exemplo, indivíduos transplantados, pacientes com câncer, com Aids ou em uso de medicação imunossupressora; condições crônicas como, hemoglobinopatias, problemas cardiovasculares, pneumopatias, insuficiência hepática, doenças renais crônicas, doenças neurológicas, doenças metabólicas (*diabetes mellitus* e obesidade grau III), doença genética (Síndrome de Down), grávidas, independente do período gestacional e pessoas com idade inferior a dois anos ou superior a 60 anos (BRASIL, 2010).

4.3.3. Diagnóstico

Doenças com sintomatologia clínica semelhante à gripe podem ser causadas por uma variedade de patógenos virais e não virais dificultando, dessa forma, o diagnóstico clínico específico em todas as faixas etárias. A confirmação laboratorial de *Influenza* e o diagnóstico precoce são muito importantes para o controle da propagação da doença e para a otimização do tratamento, permitindo o uso de uma terapia antiviral específica.

Os materiais de escolha são as amostras de secreção nasofaríngea, obtidas através do *swab* combinado (nasal e oral) e aspirado nasal, e devem ser coletadas na fase aguda da doença, nos cinco primeiros dias após o início das manifestações clínicas apresentadas pelo paciente. As amostras clínicas podem ser submetidas a uma variedade de métodos laboratoriais como técnicas rápidas de diagnóstico através de ensaios de imunofluorescência (IF), imunoenzimáticos (ELISA), detecção de ácidos nucleicos através da reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), reação de hemaglutinação (HA) e inibição de hemaglutinação (HI). Testes de diagnóstico rápido para *Influenza* estão comercialmente disponíveis em vários países e podem fornecer resultados dentro de 15 a 30 minutos, porém esses testes possuem baixa sensibilidade e a precisão do seu resultado está intimamente associada à qualidade da amostra, mas

podem ser úteis em casos de surtos localizados ou em regiões de difícil acesso quando não se tem um teste mais sensível que forneça um resultado mais rápido (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; SULLIVAN et al., 2009).

Os materiais clínicos suspeitos para *Influenza* também podem ser inoculados em ovos embrionados ou em culturas de células, principalmente MDCK (células *Madin Darby* de rim de cão), a detecção do vírus no líquido alantóico ou amniótico de ovos embrionados e em cultura de células é feita através do teste de hemaglutinação (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; WRIGHT et al., 2007).

A técnica de diagnóstico preconizada pela OMS durante a pandemia foi a reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR), pois esse método proporciona um resultado rápido e muito sensível, o que era extremamente necessário durante a pandemia tendo em vista a urgência dos exames. No Brasil, esse diagnóstico foi realizado pela Rede Nacional de Vigilância de Influenza, coordenada pelo Ministério da Saúde, que é composta por três Centros Nacionais de Referência credenciados pela OMS: o Instituto Evandro Chagas (IEC), no Pará (referência regional); o Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo (referência regional) e o Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro (referência nacional). 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.

4.3.4. Tratamento e profilaxia

Para prevenção e controle das infecções pelos vírus da gripe, tanto as vacinas quanto as drogas antivirais estão disponíveis. Com base nos dados colhidos em todo mundo, pela rede de vigilância mundial, um comitê reúne-se anualmente para formalizar as recomendações das cepas dos vírus *Influenza* que serão incluídas na composição vacinal da próxima temporada de gripe. A vacinação ainda é uma das melhores formas de profilaxia para amenizar os impactos das epidemias de *Influenza*, mas as cepas vacinais precisam ser revisadas todos os anos para acompanhar as mutações nas proteínas HA e NA dos vírus circulantes. Atualmente, a vacina contra gripe inclui duas cepas do vírus *Influenza A* humano (H1N1pdm e

H3N2) e uma cepa do vírus *Influenza B* (COUCEIRO E ALBUQUERQUE, 2008; NEUMANN et al., 2009). Além da vacinação, as drogas antivirais proporcionam uma alternativa para o tratamento e/ou profilaxia das infecções causadas pelo vírus *Influenza*.

4.3.4.1. Antivirais desenvolvidos para o tratamento da gripe

O possível papel dos antivirais e sua viabilidade na utilização como parte da resposta contra uma pandemia de gripe dependerá de vários fatores: o potencial do agente a ser tratado, a disponibilidade para a população (produção, distribuição, armazenamento e custo), o modo de administração nas unidades de saúde, a eficiência na profilaxia e/ou tratamento e a tolerância em pessoas saudáveis ou de alto risco. A possível emergência de variantes resistentes aos antivirais, assim como a patogenicidade e transmissibilidade dessas variantes também devem ser consideradas (HAYDEN, 1997).

Para que uma droga com potencial antiviral seja liberada para uso em seres humanos, há a necessidade de vários anos de estudos. As pesquisas para a liberação passam por várias etapas que são avaliadas antes que o antiviral receba a licença para ser utilizado comercialmente. No Brasil, a Agência Nacional de Saúde (Anvisa); nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA); na Europa, a *European Medicines Agency* (EMA), além de outros órgãos em cada país, concedem a licença para que um medicamento seja utilizados em seres humanos após a análise dos testes. Vale ressaltar que, até o momento, os antivirais não são capazes de curar o paciente da virose, essas drogas atuam diminuindo os sintomas, reduzindo a duração da doença ou melhorando a qualidade de vida dos pacientes. (WIGG, 2008).

A terapia antiviral desempenha um papel de extrema importância no tratamento e profilaxia durante epidemias e pandemias de gripe. Atualmente duas classes de antivirais estão aprovadas para o uso clínico contra o vírus da gripe: os clássicos, os inibidores dos canais iônicos da proteína M2, adamantanos (amantadina e rimantadina) e os da segunda geração, inibidores da neuraminidase (oseltamivir e zanamivir) (HAYDEN E PAVIA, 2006; MOSCANA, 2005; PIZZORNO et al., 2011; WEINSTOCK E ZUCCOTTI, 2009).

Os adamantanos foram desenvolvidos nos anos de 1960-1970, são específicos para o vírus *Influenza A* e estão associados ao rápido desenvolvimento de resistência viral e a reações adversas no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal. A amantadina (Symmetrel[®]) é uma amina primária que pode ser eficaz quando administrada profilaticamente e pode ser útil para diminuir a gravidade e a duração dos sintomas da doença quando administrada dentro de 48 horas após o início dos sintomas em doses de 50-200 mg por dia. Seu efeito adverso é o aparecimento de alterações no sistema nervoso central, como, nervosismo, irritabilidade, insônia e tonturas além de anorexia, náuseas e vômitos que cessam com a descontinuidade da medicação. A rimantadina (Flumadine[®]) é um composto muito similar a amantadina, porém apresenta um componente que a torna mais potente, além de apresentar menos efeitos tóxicos. A profilaxia é recomendada somente para grupos de risco: idosos acima de 60 anos e imunocomprometidos (HAYDEN, 1997; HAYDEN E PAVIA, 2006; HEDLUND et al., 2010; MOSCANA, 2005; NAFFAKH, 2008; WIGG, 2008).

Os adamantanos atuam na fase inicial da replicação, ligam-se aos canais de prótons formados pela proteína M2 do vírus *Influenza A*, bloqueando esses canais iônicos. Sem a concentração ideal de íons H⁺ no interior do vírus a proteína M1 não se dissocia do nucleocapsídeo, impedindo que o vírus migre para núcleo da célula, havendo o bloqueio da transcrição e replicação viral (NEUMANN et al., 2009; WIGG, 2008).

Nos últimos anos, o vírus *Influenza* vem mostrando resistência aos adamantanos no mundo todo. A resistência ocorre devido a mutações pontuais no gene M que corresponde a uma única substituição aminoacídica no domínio transmembrana da proteína M2, substituição de uma serina por uma asparagina na posição 31 (S31N). Essa mutação confere resistência, mas não afeta a virulência. A taxa de resistência começou a aumentar em 2003 principalmente com as cepas H3N2, atingindo uma taxa de 90% em 2006. As cepas H1N1 sazonais desenvolveram resistência aos adamantanos em proporção menor que H3N2. Atualmente cerca de 98% das cepas A (H3N2) são resistentes. Algumas cepas do vírus H5N1 também são resistentes e o vírus *Influenza* (H1N1) pdm adquiriu a resistência durante o seu rearranjo genético. As cepas resistentes possuem uma transmissão eficaz e patogenicidade semelhante às cepas sensíveis. Por esses motivos, não está sendo recomendado o uso dessas drogas nas recentes epidemias

e na última pandemia de *Influenza* (HAYDEN, 1997; HEDLUND et al., 2010; NAFFAKH, 2008; SCHNITZLER E SCHNITZLER, 2009; WEINSTOCK E ZUCCOTTI, 2009).

Os inibidores da neuraminidase são análogos do ácido siálico e, portanto, atuam na etapa de liberação das partículas virais inibindo a atividade sialidase da NA (figura 12). São específicos para os vírus *Influenza A* e *B* e são 100 vezes mais ativos do que a amantadina. Iniciando o tratamento dentro de um ou dois dias após o início dos sintomas, essas drogas podem reduzir a gravidade e diminuir o tempo de doença. Alguns estudos sugerem que elas possam também prevenir complicações como pneumonia bacteriana ou viral, ou a exacerbação de doenças crônicas. Se tomados após 48 horas do aparecimento dos sintomas, esses antivirais não têm efetividade (WIGG, 2008).

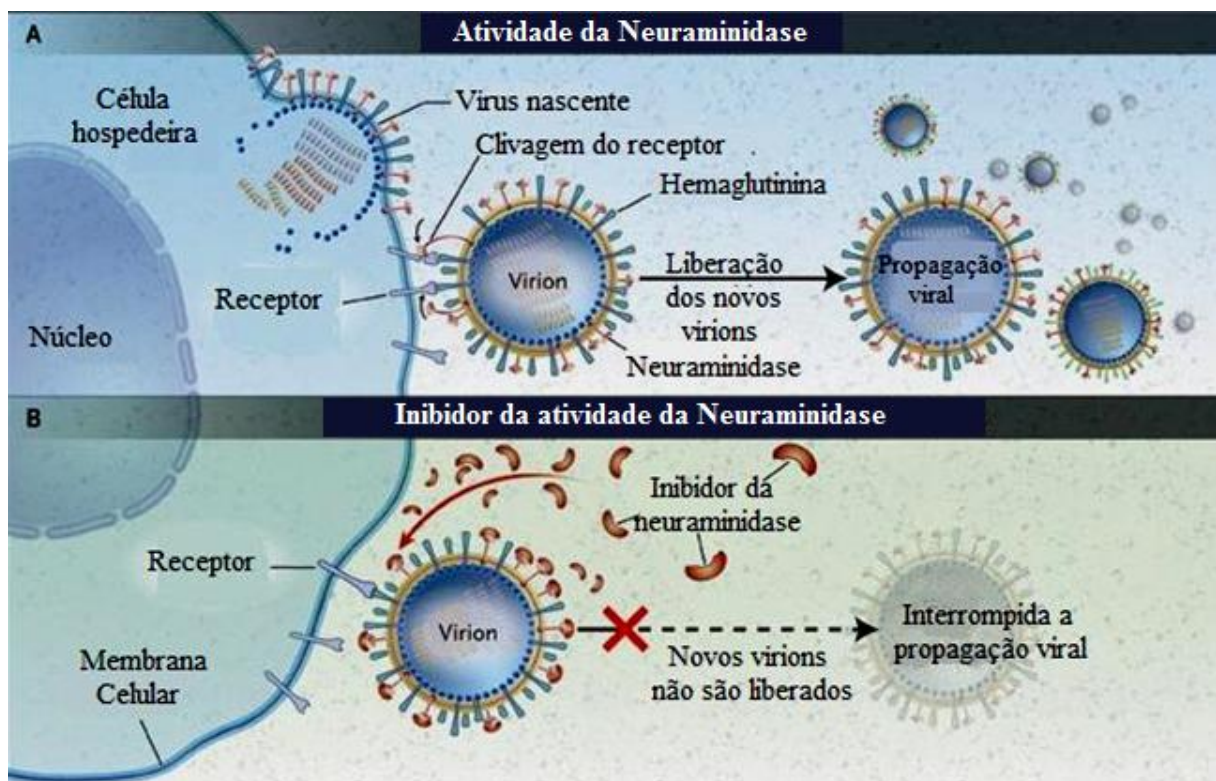


FIGURA 12: Mecanismo de ação dos inibidores da neuraminidase.
Fonte: Adaptado de Moscana, 2005.

Dois medicamentos inibidores da NA estão no mercado: O zanamivir (Relenza[®]; GlaxoSmith-Kline) foi aprovado pela FDA para profilaxia e tratamento em julho de

1999 e o oseltamivir (Tamiflu®; Roche) foi aprovado em outubro do mesmo ano (MOSS et al., 2010).

O fosfato de oseltamivir está disponível em cápsula ou em pó para suspensão líquida. É um pró-fármaco que após a administração oral é absorvido no trato gastrointestinal. No fígado é hidrolisado por esterases hepáticas e convertido em sua forma ativa, carboxilato de oseltamivir, em seguida é distribuído para todo o corpo incluindo o trato respiratório inferior e superior (CHIN E CHIN, 2010; DOUCETTE E AOKI, 2001). O metabolismo do oseltamivir não é comprometido em pacientes com insuficiência hepática e a dosagem não precisa ser ajustada (SNELL et al., 2005). A biodisponibilidade da forma ativa administrada por via oral é de 80% e atinge a sua concentração máxima após 3 a 4 horas com meia-vida de 6 a 10 horas. O fármaco é excretado principalmente através dos rins, assim, a dosagem deve ser modificada em pacientes com insuficiência renal (HE, et al., 1999; MOSCANA, 2005).

O zanamivir é um pó seco administrado por inalação, através de um aparelho (*Diskhaler*) fornecido junto com a medicação, atingindo diretamente o trato respiratório, dessa forma, quando ocorre infecção sistêmica pelo vírus *Influenza*, como já foi relatado em alguns casos de H5N1, esse medicamento não é adequado, pois apresenta absorção sistêmica baixa (DE JONG et al., 2005). Estudos demonstraram que depois de inalado 10-20% do zanamivir alcança os pulmões, o resto fica depositado na orofaringe e atinge a sua concentração máxima dentro de 1 a 2 horas, cerca de 5-15% do total da dose é absorvida e excretada na urina. Estima-se que a concentração do fármaco no trato respiratório é 1000 vezes mais elevada que a concentração mínima necessária para inibir a atividade viral, o efeito inibitório começa dentro de 10 segundos (CASS et al., 1999; MOSCANA, 2005).

O uso dessas medicações como profilaxia não é um substituto para a vacinação, mas um auxiliar para prevenir e controlar a gripe. Estudos indicaram que essas drogas são eficientes para prevenir a infecção com eficácia de 70 a 90%, principalmente em pacientes de alto risco ou profissionais de saúde, o uso profilático não é recomendado em indivíduos saudáveis (CHIN E CHIN, 2010; MOSCANA, 2005; WIGG, 2008).

Ao contrário dos adamantanos, os inibidores da NA estão associados uma taxa menor de efeitos colaterais. O oseltamivir apresenta como efeito colateral problemas gastrointestinais como náuseas, vômitos e dor abdominal em 10% dos

pacientes. Estudos no Japão descreveram efeitos neuropsíquicos, principalmente em crianças. O zanamivir pode provocar broncoespasmos e tosse especialmente em pacientes com asma ou doença crônica obstrutiva dos pulmões. Portanto, o uso desse antiviral é contraindicado em pessoas com doenças respiratórias graves (HEDLUND et al., 2010; MOSS et al., 2010; WIGG, 2008) .

Durante a última pandemia, o CDC recomendou que o tratamento da gripe fosse feito com os inibidores da NA. Foi preconizado pelo Ministério da Saúde que o oseltamivir deve ser utilizado em pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), cujo início dos sintomas tenha ocorrido no período de 48 horas. Também, a critério médico, está indicado o tratamento de pacientes com Síndrome Gripal (SG) que sejam portadores de fatores de risco. O oseltamivir deve ser utilizado durante a gravidez somente se o benefício justificar o risco potencial para o feto, sendo considerado risco de classe C (BRASIL, 2010c; CDC, 2009; SULLIVAN, 2010).

Durante a pandemia, a FDA emitiu uma autorização de uso emergencial do oseltamivir em pacientes com menos de um ano de idade e o zanamivir para pacientes a partir dos sete anos de idade. O início do tratamento não deve ser feito apenas após a confirmação laboratorial, deve ser iniciado com base na análise clínica do médico (CDC, 2009; MOSS et al., 2010).

As dosagens recomendadas para o oseltamivir estão no quadro 2:

Quadro 2 - Dosagem de oseltamivir por peso e frequência diária.

Peso	Dose	Frequência
Menos de 15 Kg	30 mg	2x ao dia por 5 dias
De 15 a 23 Kg	45 mg	2x ao dia por 5 dias
De 23 a 40 Kg	60 mg	2x ao dia por 5 dias
Acima de 40 Kg	75 mg	2x ao dia por 5 dias

Fonte: CDC, 2009.

Para crianças com menos de um ano de idade é recomendado o uso de 3 mg/Kg duas vezes ao dia durante cinco dias (CDC, 2009).

Pacientes que não apresentarem resposta ao oseltamivir, quando este for introduzido até 48 horas do início dos sintomas, que estejam em unidade hospitalar,

e pacientes imunocomprometidos que não apresentarem resposta ao oseltamivir, devem usar o zanamivir da seguinte forma: adultos e crianças com idade igual ou superior a sete anos utilizar 10mg duas vezes por dias durante cinco dias (BRASIL, 2010).

O tratamento dos casos leves e moderados que não apresentarem sinais de alerta nem fatores de risco deve ser semelhante ao tratamento de qualquer síndrome gripal aguda, tendo atenção para a possibilidade de complicação. Logo, devem ser utilizados medicamentos sintomáticos para dor e febre, além de orientar a alimentação e de manter a hidratação do paciente (BRASIL, 2010c).

O nucleosídeo sintético, ribavirina, apresenta atividade para muitos vírus quer sejam de DNA ou RNA. Foi licenciada pela FDA em 1986 para tratamento de infecções pelo vírus respiratório sincicial (VRS) e também apresenta atividade contra os vírus *Influenza* A e B. É administrada na forma de aerossol e estudos demonstraram que quando administrada por via oral ou intravenosa pode ser útil para o tratamento de pneumonia causada pelo vírus *Influenza* (HAYDEN, 1997; WIGG, 2008).

4.3.4.2. Resistência aos inibidores da neuraminidase

A resistência viral resulta de substituições aminoacídicas em sítios conservados no sítio ativo da proteína NA. A diferença na geometria de interação dos diferentes antivirais com os resíduos aminoacídicos da NA poderia explicar porque algumas cepas adquirem resistência a certos antivirais e a outros não, ou seja, os marcadores moleculares de resistência são específicos para os subtipos de *Influenza* e para os antivirais. Variantes resistentes replicam eficientemente em culturas de células, mas a maioria mostra reduzida infecciosidade e virulência em modelos animais. Pacientes imunocomprometidos são mais suscetíveis a gerar cepas resistentes por apresentarem períodos mais prolongados de infecção viral (DEYDE et al., 2010; GUBAREVA et al., 2000).

Nos anos de 2007-2008 cepas resistentes do vírus H1N1 sazonal emergiram e propagaram-se rapidamente, inclusive em países que não prescreviam oseltamivir regularmente. Já em 2008-2009 mais de 99% dessas cepas apresentavam a mutação H275Y (substituição de uma histidina por uma tirosina na

posição 275) que é equivalente a mutação H274Y na N2 que confere alta resistência ao oseltamivir. De acordo com o CDC, a frequência de resistência ao oseltamivir de cepas H1N1 sazonais nos Estados Unidos cresceu de menos de 0,5% em 2006-2007, para 13% em 2007-2008 e para 99% em 2008-2009 (TRIANA-BALTZER et al., 2009a). Essa mutação também foi encontrada em pacientes tratados que estavam infectados pelo vírus H5N1.

Vários estudos relatam o aparecimento de outras substituições que conferem resistência aos diferentes antivirais. Recentemente, verificou-se que a mudança aminoacídica N294S (substituição de uma asparagina por uma serina na posição 294) confere resistência ao oseltamivir para o subtipos H3N2, H1N1 e H5N1 (PIZZORNO et al., 2011). O vírus *Influenza B* com as substituições R152K e D198N são resistentes ao zanamivir e oseltamivir, respectivamente (GHEDIN et al., 2011). Aeron Hurt e colaboradores (2009) identificaram a substituição Q136K (substituição de uma glutamina por uma lisina na posição 136) que reduz a sensibilidade ao zanamivir para os subtipos H3N2 e H1N1 (HURT et al., 2009).

Estudos recentes têm demonstrado que substituições em outros resíduos localizados na NA e em torno do seu sítio ativo podem alterar a susceptibilidade dos vírus *Influenza* para os inibidores da NA. Por exemplo, alterações nos resíduos V116, I117, K150, D151 e I223 foram associados com susceptibilidade reduzida aos inibidores NA (DEYDE et al., 2010).

Em relação ao vírus H1N1pdm, a OMS publicou em 2010 uma taxa de 1%-1,5% de cepas resistentes. A transmissão do vírus H1N1 pandêmico resistente tem sido relatada em ambientes fechados ou em contato muito próximo com pessoas infectadas. Um estudo feito na Austrália identificou transmissão comunitária sustentada com cepas do vírus H1N1 pdm resistentes ao oseltamivir. Neste estudo foram analisados 182 pacientes positivos para H1N1 pdm entre maio e agosto de 2011; um total de 29 amostras (16%) apresentaram a substituição H275Y (HURT et al., 2011). Novas alterações aminoacídicas estão sendo associadas a uma possível resistência antiviral em cepas H1N1pdm como I223R, E119V, I117V e D199N (ESHAGHI et al, 2011; ESPÍNOLA, 2012; HURT et al., 2012; PIZZORNO et al., 2011).

A ligação da neuraminidase ao oseltamivir envolve uma alteração conformacional na cadeia lateral do resíduo de ácido glutâmico na posição 276 (E276) da NA. Nessa conformação, o ácido glutâmico “gira” e se liga ao aminoácido

arginina na posição 224 (R224), dando estabilidade para a ligação do oseltamivir. A presença de uma mutação pode inibir essa rotação. Além disso, quando ocorre a substituição H274Y, a presença de uma tirosina, que é mais volumosa que a histidina, na posição 274, empurra o grupo carboxilo da posição E276 mais para dentro do sítio de ligação, dificultando a ligação do oseltamivir (figura 13).

O grupo 1 da NA (N1, N4, N5, N8) tem outra tirosina abaixo do local do sítio ativo, na posição 252. A combinação de duas tirosinas (Y252 e Y274) altera o espaço que normalmente acomoda o oseltamivir. Em contrapartida, o grupo 2 da NA (N2, N3, N6, N7, N9) tem uma treonina na posição 252 e, com isso, consegue acomodar o oseltamivir com mais facilidade na presença da mutação (AOKI et al., 2007; WEINSTOCK E ZUCCOTTI, 2009).

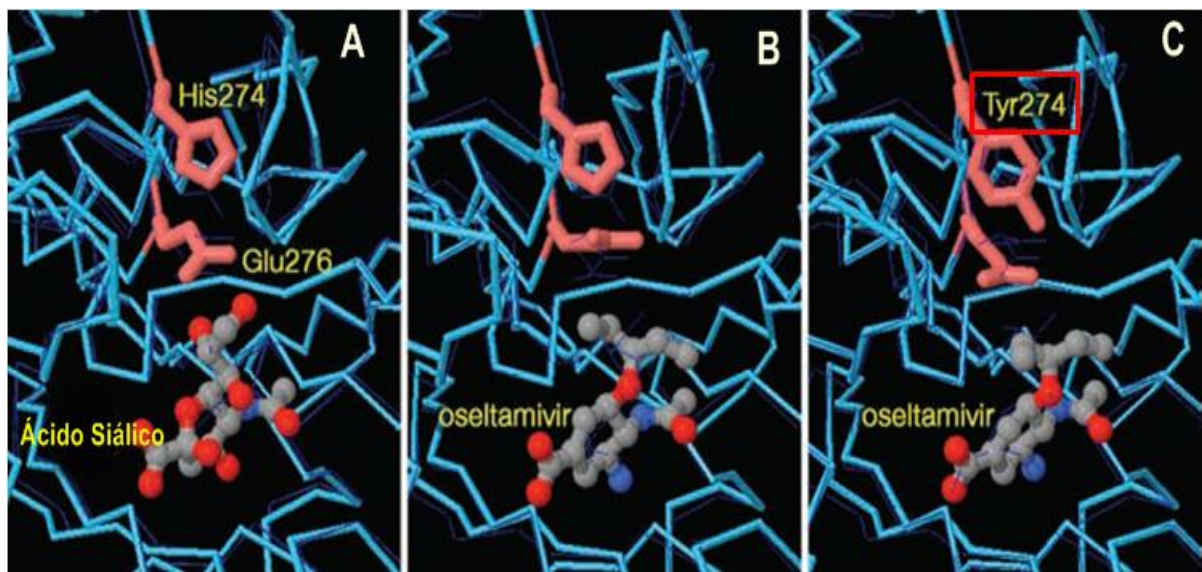


Figura 13: Alteração conformacional da neuraminidase (NA) na presença da substituição H274Y. A) ácido siálico ligado ao sítio ativo da NA. B) oseltamivir no sítio ativo da NA. C) NA apresentando a substituição aminoacídica na posição 274.

Fonte: Adaptado de Protein data Bank, 2009.

Acreditava-se que a substituição H274Y diminuía a atividade viral. No entanto, devido a facilidade de transmissão e significativa patogenicidade em pacientes de alto risco, admitiu-se que cepas com essa mutação podem ter o mesmo grau de virulência de outras cepas (DAHRAN, 2009).

No quadro 3 estão descritas as principais substituições aminoacídicas identificadas na NA e relacionadas a resistência ao antiviral:

Quadro 3 – Principais substituições aminoacídicas na neuraminidase encontradas nos vírus *Influenza A* e *B*, relacionadas a resistência antiviral.

Mutação NA	Subtipo	Antivirais			Referência
		Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir	
E119G	B	RS	RS	R	Jackson et al, 2005.
D198N	B	R	RS	S	Gubareva, 2004.
R152K	B	R	R	R	Gubareva, 2004.
E119D	B	R	R	R	Jackson et al, 2005.
E119A	B	R	R	R	Jackson et al, 2005.
E119V	H3N2	R	S	S	Gubareva, 2004.
H274Y	H3N2	R	S	R	Gubareva et al, 2001.
R292K	H3N2	R	RS	RS	Carr et al, 2002.
Q136K	H3N2	S	RS	S	Hurt et al, 2009.
N294S	H3N2	R	R	RS	Pizzorno et al, 2011
R224K	H3N2	R	R	S	Yen et al, 2006; Lackenby et al, 2008.
I222V	H3N2	RS	RS	S	Dayde et al, 2010.
E119D	H3N2	S	R	S	Zurcher et al, 2006.
H275Y	H1N1 sazonal/pdm	R	S	R	Gubareva et al, 2001.
Q136K	H1N1 pdm		RS	?	Hurt et al, 2009.
N295S	H1N1 sazonal	R	R	S	Pizzorno et al, 2011
I223V	H1N1 sazonal	RS	RS	S	Dayde et al, 2010.
I117V	H1N1 pdm	RS	S	S	Hurt et al, 2012.

R= resistente; S= sensível; RS= redução da sensibilidade.

4.3.4.3. Antivirais em desenvolvimento para o tratamento da gripe

O desenvolvimento de novos agentes antivirais se impõe para a obtenção de drogas que tenham um espectro de ação maior em relação aos tratamentos atuais (BOLTZ et al., 2010; HEDLUND et al., 2010).

O peramivir (BioCryst) é um potente inibidor da NA viral com atividade contra os vírus *Influenza A* e *B*. Similar ao zanamivir, o peramivir demonstrou ter

uma biodisponibilidade oral baixa, portanto foi desenvolvido para administração intravenosa. Estudos mostraram que a administração intravenosa diminuiu significativamente o tempo necessário para alcançar a estabilidade clínica em pacientes hospitalizados e não demonstrou nenhuma inferioridade ao oseltamivir em relação ao tempo para o alívio dos sintomas. No entanto, verificou-se que cepas contendo a mutação H274Y, que confere resistência ao oseltamivir, são menos suscetíveis ao peramivir. Estudos para a administração intramuscular também estão sendo realizados e apresentam resultados positivos (HEDLUND et al., 2010; MOSS et al., 2010).

Comparado ao zanamivir, o peramivir demonstrou que a atividade inibitória contra as cepas H3N2 e H1N1 aumentou de 3 a 4 vezes (CHIN E CHIN, 2010). Em 23 de outubro de 2009 a FDA liberou o uso do peramivir com administração intravenosa em pacientes hospitalizados, incluindo pacientes pediátricos, com suspeita ou confirmação para o vírus *Influenza A* (H1N1) pdm. Em 2010, o peramivir também foi aprovado para comercialização no Japão (MOSS et al., 2010).

O laninamivir (R-125489) é um antiviral muito promissor de ação prolongada com estrutura semelhante ao zanamivir atuando como inibidor da NA. Seu pró-fármaco, laninamivir octanoato (CS-8958) é administrado através da inalação e o desenvolvimento está sendo realizado pela Biota Holdings da Austrália e Daiichi-Sankyo e Pharmaceuticals do Japão. Está em fase III de teste e os estudos vêm demonstrando que uma única inalação apresentou padrões de eficácia semelhantes ao oseltamivir com atividade *in vivo* e *in vitro* contra o vírus *A* (H1N1) pdm. Possui eficiente capacidade para inibir cepas resistentes ao oseltamivir. Semelhante ao oseltamivir que é processado para sua forma ativa no fígado, o laninamivir octanoato é processado para laninamivir no pulmão. Em setembro de 2010 seu uso foi aprovado no Japão (CHIN E CHIN, 2010; CHRISTOPHER et al., 2011; HEDLUND et al., 2010; MOSS et al., 2010).

O T-705, conhecido como favipiravir, possui uma atividade inibitória potente contra os vírus *Influenza A*, B e C e outros vírus de RNA. É um inibidor da polimerase viral que age como um análogo de nucleosídeo e interfere na atividade da polimerase viral impedindo o processo de replicação com ação similar a ribavirina. Segundo Kiso et al., a droga protegeu camundongos contra infecção pelo vírus H5N1 altamente patogênico, sendo que estudos revelaram que o oseltamivir

apresenta eficácia limitada contra vírus H5N1 em modelos animais. Atualmente está em fase II de estudos no Japão (HEDLUND et al., 2010; KISO et al., 2010).

Atualmente está sendo desenvolvida uma nova droga que tem como alvo a célula do hospedeiro. A DAS181 (Fludase[®]) é uma proteína de fusão recombinante que contém um domínio catalítico de sialidase. É o primeiro antiviral que tem como alvo os receptores de ácido siálicos da célula hospedeira. A atividade sialidase dessa droga cliva e inativa tais receptores (AS α 2,3Gal e AS α 2,6Gal) impedindo a ligação e a entrada do vírus na célula hospedeira. Em modelos animais mostrou eficácia profilática e terapêutica contra os vírus *Influenza A* e *B* e parainfluenza, que também utilizam os mesmos receptores (HEDLUND et al., 2010; MOSS et al., 2010; TRIANA-BALTZER et al., 2010). DAS181 foi desenvolvido para funcionar topicamente na superfície das vias aéreas, é um pó seco administrado por inalação com dose de 5-20 mg por dia durante 5 dias (LARSON et al., 2011; TRIANA-BALTZER et al., 2010). Estudos revelaram que o DAS181 foi eficaz contra cepas com a mutação H274Y (TRIANA-BALTZER et al., 2009a). DAS181 também mostrou atividade *in vivo* e *in vitro* contra cepas do vírus H1N1 pdm (TRIANA-BALTZER et al., 2009b). Foi observada uma boa tolerância dos efeitos adversos na fase I de estudos clínicos. Atualmente os estudos encontram-se na fase II (HEDLUND et al., 2010).

No quadro 4 encontram-se os principais antivirais desenvolvidos atualmente:

Quadro 4 - Antivirais em desenvolvimento para o tratamento da gripe.

Candidatos	Mecanismo de ação	Modo de administração	Fase de desenvolvimento	Desenvolvido por
Laninamivir (CS-8958)	Inibição da liberação das partículas virais	Inalação	Fase III (Japão)	Biota/Daiichi-Sankyo
Peramivir	Inibição da liberação das partículas virais	Intravenosa	Fase III	BioCryst Pharmaceuticals
Favipiravir (T-705)	Inibição da replicação viral	Oral	Fase II	Toyama Chemical Co., Ltd (a subsidiary of Fuji Holdings)
Fludase (DAS181)	Inibição da ligação ao receptor da célula hospedeira	Inalação	Fase II	NexBio Inc.

Fonte: Adaptado de Hedlund et al., 2010.

A figura abaixo ilustra todos os antivirais citados no texto nas diferentes fases do ciclo replicativo:

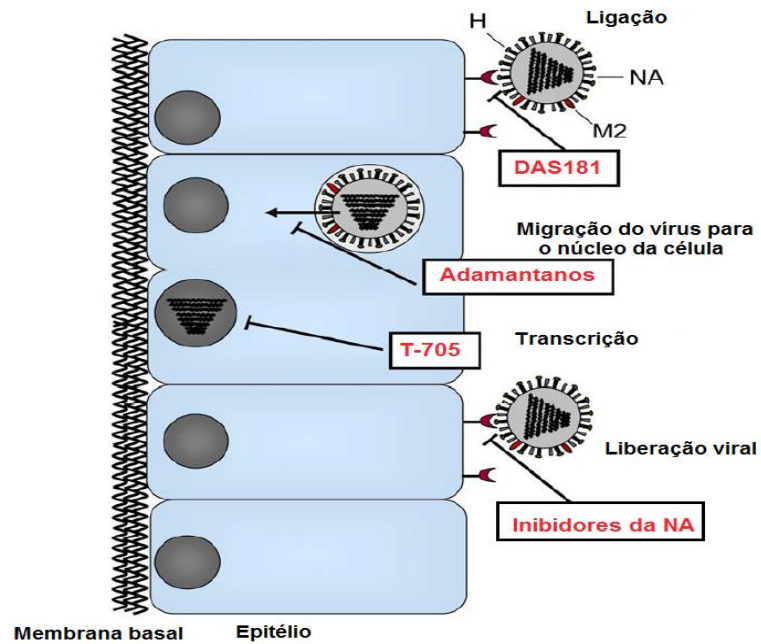


Figura 14: Antivirais agindo nos diferentes estágios do ciclo replicativo do vírus *Influenza*.
Fonte: Adaptado de Hedlund et al., 2010.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal de caráter descritivo.

5.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população investigada foi constituída de indivíduos de ambos os sexos e diferentes faixas etárias, triados pela Rede de Vigilância da Gripe, no período de maio de 2009 a maio de 2012 procedentes da mesorregião metropolitana de Belém. As mesorregiões foram instituídas pela Resolução da Presidência do IBGE nº. 11, de 5 de junho de 1990. Desse modo a mesorregião metropolitana de Belém 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).

A amostra foi constituída por pacientes com gripe A (H1N1) pdm confirmados laboratorialmente, provenientes de ambulatórios ou internações hospitalares.

5.3. AMOSTRAS

Os espécimes clínicos utilizados na investigação foram de aspirado nasofaríngeo (ANF) ou *swab* combinado (narina/garganta), obtidos a partir de pacientes que apresentavam sinais e sintomas de gripe com até cinco dias de evolução, atendidos em unidades de saúde da mesorregião metropolitana de Belém.

A unidade de saúde primeiramente notificava os casos suspeitos e informava a Secretária Estadual de saúde (SESPA), que por sua vez acionava os técnicos do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Pará (LACEN-PA) para a realização da coleta de secreção respiratória e encaminhamento das amostras ao Instituto Evandro Chagas.

A coleta do ANF 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).

5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Amostras clínicas de pacientes com diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus *Influenza A (H1N1) pdm* 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 como: calafrios, dor de garganta, mialgia ou artralgia, e pacientes que não apresentavam algum tipo de comorbidade.

5.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes que não apresentavam síndrome respiratória aguda grave (SRAG).

5.6. TAMANHO AMOSTRAL

Para cálculo do tamanho amostral foi utilizado o nível de confiança de 95%, a um erro amostral de 2,5% e proporção conhecida da mutação na população de 1,5%. Foram obtidas 739 amostras positivas para H1N1 pdm na mesorregião metropolitana de Belém no período de maio de 2009 a dezembro de 2010, das

quais, utilizando os critérios de exclusão, foram selecionadas 336, cujo resultado do cálculo amostral foi de 72 amostras. Em seguida, através do *software Bio Estat 5.0* (AYRES et al., 2007), foi calculada a amostragem estratificada, no qual foi sugerido o n amostral para os anos de 2009 e 2010. No ano de 2011 não foi identificado nenhuma amostra positiva para H1N1 pdm, no ano de 2012, as cinco amostras positivas foram incluídas na pesquisa e os 28 óbitos positivos obtidos (todos dos anos de 2009 e 2010) foram testados.

5.7. 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 colheita. Todas as alíquotas foram mantidas a -70°C .

5.8. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL (RNA_v)

O RNA_v foi extraído a partir do espécime clínico utilizando-se o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)*, seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, o método consiste em três etapas principais: lise, lavagem e eluição. O RNA eluído foi estocado a -70°C ou imediatamente submetido a RT-PCR.

5.9. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR REACÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) EM TEMPO REAL

Para detecção do genoma viral foi utilizada a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real de acordo com protocolo preconizado pela Organização Mundial da Saúde.

Nesta etapa foram utilizados detectores (*primer* e sonda) específicos para genes do vírus *Influenza A (H1N1) pdm*: InfA, Suíno universal (swFluA), Suínos H1

(swH1) e RNaseP (RP), demonstrados no quadro 6. O *primer* e sonda da RNaseP tem como função detectar RNase P de gene humano e, portanto, serve como controle interno positivo para ácido nucléico humano, fornecendo um controle secundário que valida o procedimento de extração dos ácidos nucléicos e integridade dos reagentes. Os controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação. A reação foi realizada com o Kit comercial *SuperScript III™ One-step qRT-PCR with Platinum Taq®* - (Invitrogen Life Technologies) para um volume final de 25µl, contendo 20µl de *mix* onde a quantidade de cada reagente adicionado para cada *primer* e sonda estão descritos no quadro abaixo:

QUADRO 5 - Descrição do volume de cada reagente que deve constituir a *mix* por reação.
* N = número de amostras + controle positivo e negativo

Reagentes	Volume por reação
Água livre de nuclease (Water free DNase/ RNase)	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® Taq Mix	N x 0.5 µl
Master Mix PCR 2X	N x 12.5 µl
Volume total	N X 20.0 µl

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 por 15 segundos e 55°C por 30 segundos.

As seqüências de *primers* e sondas estão especificadas no quadro 6.

QUADRO 6 - Sequência de *primers* e sondas utilizadas na RT-PCR em tempo real.

Primers e Sonda	Sequência (5'>3')	Concentração
InfA <i>Forward</i>	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 µM
InfA <i>Reverse</i>	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 µM
InfA <i>Probe</i> ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 µM
SW InfA <i>Forward</i>	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 µM
SW InfA <i>Reverse</i>	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 µM
SW InfA <i>Probe</i> ²	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA	10 µM
SW H1 <i>Forward</i>	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 µM
SW H1 <i>Reverse</i>	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 µM
SW H1 <i>Probe</i> ²	CA GAA TAT ACA " T" CC RGT CAC AAT TGGARA A	10 µM
RnaseP <i>Forward</i>	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40 µM
RnaseP <i>Reverse</i>	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40 µM
RnaseP <i>Probe</i> ¹	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	10 µM

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.

A interpretação dos resultados para detecção do genoma viral pela RT-PCR em tempo real está descrita no quadro abaixo:

QUADRO 7 - Interpretação dos resultados da RT-PCR em tempo real de acordo com os quatro marcadores utilizados para a detecção do genoma viral.

	A	ASw	H1Sw	RNaseP	Resultados
Amostra	+	+	+	+	Influenza A/H1Sw
Amostra	+	-	-	+	Influenza A Sazonal
Amostra	-	-	-	+	Negativo
Amostra	-	-	-	-	Amostra Inadequada

5.10. ISOLAMENTO VIRAL

O isolamento viral foi realizado a partir dos espécimes considerados positivos pela Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real. Essas amostras positivas foram inoculadas diretamente em placas e/ou garrafas de cultivos celulares da linhagem contínua de células de rim de cachorro (MDCK - *Madin Darbin Canine Kidney*), sensíveis ao crescimento do vírus *Influenza*.

Os cultivos foram mantidos em garrafas plásticas contendo Meio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) acrescido de bicarbonato de sódio na concentração de 1,5g/L, soro bovino fetal 10%, L-glutamina 4mM, HEPES 10mM, penicilina 100u/ml e estreptomicina 100µg/ml. Para a inoculação dos espécimes foram preparadas placas, as quais, após a inoculação, foram mantidas em estufa de dióxido de carbono (CO₂) a 37C^o com o meio de manutenção (menor concentração de soro bovino comparado ao meio de crescimento e acréscimo de anfotericina B) adicionado de tripsina cristalina 1 µg/ml.

As culturas foram observadas diariamente ao microscópio óptico invertido, na procura de evidências do crescimento de viral. Adicionalmente, a cada quatro dias uma amostra do fluido da cultura foi testada quanto à presença de atividade hemaglutinante (HA) indicativa de proliferação viral. As amostras com resultados positivos foram então selecionadas e estocadas a -70°C para testes posteriores.

5.11. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

As amostras que foram positivas para A (H1N1) pdm e isoladas em cultivo celular, foram submetidas a caracterização genética do gene NA utilizando-se 3 etapas principais: a) extração do RNA_v; b) amplificação do RNA_v pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) seguida de semi-nested (PCR); c) sequenciamento do gene de interesse.

5.11.1. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral para a caracterização genética foi realizada a partir do cultivo celular infectado seguindo as orientações do fabricante do *PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen Life Technologies)*. Resumidamente, o método consiste em três etapas principais: lise, lavagem e eluição. O RNA eluído foi estocado a -70°C ou imediatamente submetido a RT-PCR.

5.11.2. Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) seguida de semi-nested (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase precedida de transcrição reversa (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 primers específico para o gene da neuraminidase do vírus A (H1N1) pdm para um volume final de $25\mu\text{L}$, contendo, $5\mu\text{L}$ de RNAv, $0.2\mu\text{L}$ de cada oligonucleotídeo iniciador ($50\text{ pmol}/\mu\text{L}$) (quadro 7), $12.5\mu\text{L}$ de tampão de reação 2X (contendo 0.4mM de cada dNTP, 2.4mM de MgSO_4), $0.12\mu\text{L}$ de inibidor de ribonuclease $40\text{U}/\mu\text{L}$ (*RNAse Inhibitor*, Promega), $0.5\mu\text{L}$ de mix RT/Taq (*SuperScript™ RT/Platinum Taq*), e $6.5\mu\text{L}$ de água livre de nuclease (*Water free DNase/ RNase*). Em seguida, a mistura foi submetida a transcrição reversa a $42^{\circ}\text{C}/45'$, $55^{\circ}\text{C}/15'$ e $95^{\circ}\text{C}/5'$ e PCR com 30 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/45''$, $60^{\circ}\text{C}/45''$ e $72^{\circ}\text{C}/2'$.

Posteriormente, foi realizada a etapa de semi-nested (PCR) para um volume final de $50\mu\text{L}$, contendo, $2\mu\text{L}$ do produto da RT-PCR, $0.5\mu\text{L}$ de cada oligonucleotídeo iniciador ($50\text{ pmol}/\mu\text{L}$) (quadro 8), $5\mu\text{L}$ de tampão 10x, $2\mu\text{L}$ de dNTP, $1.45\mu\text{L}$ de cloreto de magnésio (MgCl_2), $0.25\mu\text{L}$ de Taq DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*) e $38.3\mu\text{L}$ de água livre de nuclease (*Water free DNase/ RNase*). Em seguida, a mistura foi submetida a reação de amplificação com ativação da Taq polimerase a 95°C por $5'$ e 30 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/45''$, $60^{\circ}\text{C}/45''$ e $72^{\circ}\text{C}/2'$. Cada conjunto de amostras submetido à amplificação foi acompanhado de um controle positivo e um negativo.

QUADRO 8 - Sequência de *primers* utilizados na RT-PCR e semi-nested (PCR).

Identificação	Sequências (5'-3')	Tamanho do Amplicon
N1S +/- 1	AGCAAAGCAGGAGT TTAAAA	1449 pb (RT-PCR)
N1S -/ 1450	CAAGGAGTTTTTTGAACAAATTAC	
N1S +/- 299	TGTTAGTGGATGGGCTATATACA	1151 pb (semi-nested)
N1S -/ 1450	CAAGGAGTTTTTTGAACAAATTAC	

Ao término da amplificação, as amostras positivas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado por *SYBR[®] Safe DNA gel stain* (*Invitrogen Life Technologies*), com tampão 1X tris-acetato-EDTA (TAE). O marcador de peso molecular *SmartLadder[®]* (*Eurogentec*) foi aplicado em cada gel. A visualização dos amplicons impregnados pelo *SYBR[®] Safe* foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta (UV) e fotografado com auxílio do sistema de fotodocumentação *Vilber Loumart*.

5.11.3. Purificação e quantificação do produto do semi-nested (PCR)

Em seguida, nas amostras que apresentaram a banda de interesse, foi realizada a purificação do produto do semi-nested, utilizando o kit comercial *MEGAquick-spin PCR & AGAROSE GEL DNA EXTRACTION* (*Bioeasy*). O produto eluído foi então quantificado seguindo instruções do fabricante do marcador de peso molecular *Low Mass Ladder* (*Invitrogen Life Technologies*). A concentração de cada amostra foi determinada comparando-se a intensidade das bandas do marcador com a banda das amostras, sendo o resultado expresso em nanogramas (ng).

5.12. SEQUENCIAMENTO DO GENE DA NEURAMINIDASE

5.12.1. Método de Sanger

O método de bloqueio de cadeia descrito por SANGER et al. (1977) tem como fundamento o emprego de dideoxynucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos.

A reação de sequenciamento pelo método de sanger foi feita com o Kit *Big Dye® terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystem)* e foi composta pela mistura de DNA viral amplificado (40-50 ng), *Big Dye* contendo os dideoxynucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, tampão de reação, iniciadores específicos senso e reverso (2.5 pmol/μL) (quadro 9) e se necessário água para volume final de 10μl. 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.

QUADRO 9 - Sequência de *primers* utilizados na reação de sequenciamento do gene NA.

Identificação	Sequências (5'-3')
N1S+/299	TGTTAGTGGATGGGCTATATACA
N1S+/638	CAGACACTATCAAGAGTTGGA
N1S+/953	GCAGTGGGATTTTCGGACACAA
N1S-/749	GGT CAT TAC AGT AAA GCA AGA AC
N1S-/1450	CAAGGAGTTTTTTGAACAAATTAC

5.12.2. Precipitação da Reação de Sequenciamento

A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada pela adição de 40μl 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 foi cuidadosamente removido e o volume de 200μl de etanol a 70% foi adicionado a placa. A nova etapa

de centrifugação foi realizada durante 20 minutos a 4.000 rpm, objetivando a precipitação do DNA contendo os dideoxinucleotídeos marcados. Finalmente, o etanol foi removido, e a placa submetida a 95°C durante cinco minutos para completa evaporação do etanol.

5.12.3. Eletroforese em sequenciador automático

O DNA precipitado foi reconstituído em 15uL 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 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.

5.12.4. Alinhamento, edição das sequências e construção da árvore filogenética.

Para a análise das sequências obtidas pelo método de Sanger et al. (1977), inicialmente as mesmas foram avaliadas em qualidade pela observação do sinal expresso em cores obtido para cada nucleotídica sequenciada, onde as cores azul, verde, amarelo e vermelho correspondem as qualidades ótima, boa, duvidosa e péssima, respectivamente. Sequências de qualidade ótima deverão apresentar índices percentuais superiores a 95% quando combinadas as qualidades, ótima e boa. As demais sequências tiveram o processo de sequenciamento repetido. Posteriormente, as sequências foram alinhadas e editadas utilizando o programa BioEdit v 7.0 e comparadas com seqüências de outros vírus isolados e disponíveis no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando os

programas Clustal W v 1.7 (Thompson et al., 1994) e MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011). Em seguida, foram avaliadas quanto a presença de mutações e substituições aminoacídicas relacionadas à resistência aos antivirais.

A construção da árvore filogenética foi efetuada com a aplicação do método de *neighbor joining* (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) implementado no programa MEGA 5.05. Foi aplicado também, o teste de bootstrap conjuntamente aos métodos de NJ fixando-se 1000 réplicas para proporcionar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos. A matriz de distância no método de NJ foi calculada a partir das seqüências alinhadas usando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980).

5.13. MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS

5.13.1. Alinhamento do modelo estrutural (*template/alvo*)

A seqüência 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 seqüência 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 seqüência designada e as estruturas 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 seqüência de uma proteína normalmente resulta em pequenas mudanças em sua estrutura tridimensional (LESK et al., 2001).

Primeiramente foi necessária a busca de *templates* em um banco de dados de estrutura de proteínas. A busca dos moldes tridimensionais foi realizada utilizando-se o programa *BLASTp do Web Server SWISS-MODEL* ([swissmodel.expasy.org](http://www.expasy.org)) que seleciona as estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados de estruturas de proteínas (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>). A estrutura molde (*template*) selecionada foi a 3TI4, utilizando o programa *MODELLER* 9.10 (SALI E BLUNDELL, 1993) para executar o alinhamento das seqüências do *template/alvo*, sendo escolhido os moldes mais apropriados para a construção dos modelos.

5.13.2. Construções do Modelo

Uma vez realizado o alinhamento entre as sequências do alvo e do *template*, os modelos 3D foram construídos utilizando-se a modelagem molecular comparativa por satisfação das restrições espaciais implementadas no programa *MODELLER* 9.10 (SALI E BLUNDELL, 1993). Escolhemos os modelos pela otimização da função objetivo no espaço cartesiano, e este teve a menor energia, assim garantindo sua maior integridade.

5.13.3. Avaliação dos Modelos

Os modelos foram avaliados 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. Utilizamos o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) para a validação da qualidade estereoquímica global dos modelos 3D, 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, bem como choques entre pares de átomos não ligados. Além do programa VERIFY3D (LUTHY et al., 1992) que foi empregado para a avaliação da compatibilidade da estrutura tridimensional com a sua sequência aminoacídica. Os modelos foram visualizados através do programa Pymol 1.5 (<http://www.pymol.org/>).

5.14. 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/UFPA com o protocolo nº 016/2010 (anexo).

6. FONTES FINANCIADORAS

O projeto em questão teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e Instituto Evandro Chagas.

7. RESULTADOS

No período de maio de 2009 a maio de 2012 foram recebidas no Laboratório de Vírus Respiratórios 2619 amostras de secreções respiratórias de pacientes que apresentavam sinais e sintomas de infecção respiratória aguda (IRA) com até cinco dias de evolução. Desse total, 744 (28,4%) foram positivas para *Influenza A H1N1 pdm* através do RT-PCR em tempo real (tabela 3).

Tabela 3: Número de amostras recebidas e positivas para H1N1 pdm no período de estudo.

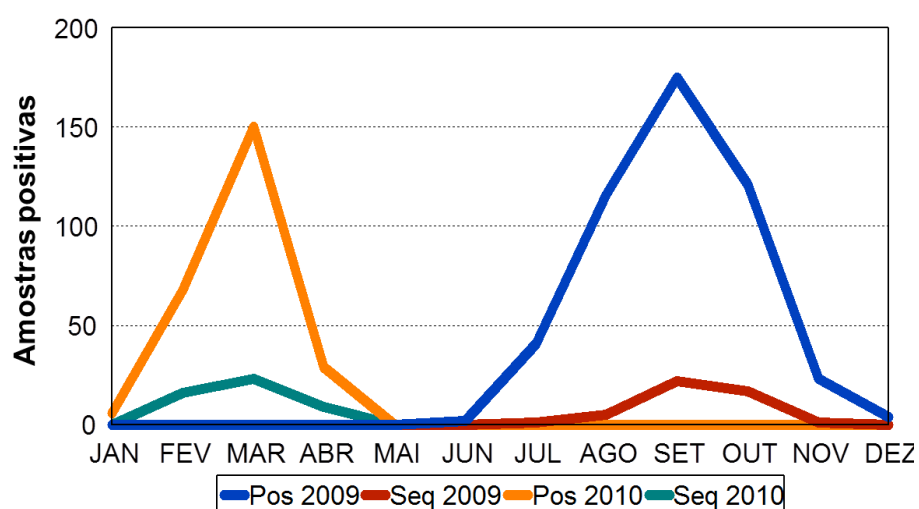
Ano	Amostras recebidas	Amostras positivas
2009	1186	485 (40,8%)
2010	1037	254 (24,4%)
2011	162	0 (0%)
2012	234	5 (2,1%)
Total	2619	744

Foi feita a amplificação para o gene da neuraminidase em 98 amostras distribuídas na região e período de estudo, sendo 46 amostras do ano de 2009, 48 de 2010 e quatro de 2012. Adultos jovens (n=54) e o sexo feminino (n=57) foram os mais prevalentes no estudo (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição por faixa etária e sexo das amostras sequenciadas.

Ano	Faixa Etária					Sexo	
	0-4	5-14	15-24	25-59	>60	Feminino	Masculino
2009	4	20	13	8	1	25 (43,8%)	21 (51,2%)
2010	8	11	13	16	0	29 (50,8%)	19 (46,3%)
2012	0	0	2	2	0	3 (5,2%)	1 (2,4%)
Total	12	31	28	26	1	57 (100%)	41 (100%)

Durante o período pandêmico observamos a ocorrência de duas ondas da doença na região norte do Brasil, principalmente no estado do Pará. A primeira onda, que ocorreu durante os meses de agosto, setembro e outubro de 2009, atingiu todo o Brasil; a segunda onda que ocorreu nos meses de fevereiro, março e abril de 2010, predominantemente na região norte (figuras 15).

**Figura 15:** Ocorrência sazonal de todas as amostras positivas para H1N1pdm e das sequenciadas para o gene NA nos anos de 2009 e 2010.

O sequenciamento parcial do gene NA evidenciou que duas amostras de 2010 apresentaram a substituição aminoacídica D199N, que já foi relatada em vários estudos, mostrando uma possível associação com o aumento da resistência ao oseltamivir (figura 16). Estas cepas foram isoladas nas cidades de Castanhal e Belém, um dos pacientes que apresentou essa substituição estava internado e fazia uso do oseltamivir, o outro paciente não estava utilizando o medicamento, ambos eram adultos jovens.

As quatro amostras sequenciadas de 2012 apresentaram duas substituições aminoacídicas (V241I e N369K) (figura16) que não estão relacionadas a resistência e não estão nos sítios antigênicos, mas são citadas em vários trabalhos apresentando importância filogenética e demonstrando a evolução viral desde 2009 através do surgimento e acúmulo de determinadas substituições aminoacídicas.

A substituição H275Y, que confere alta resistência ao oseltamivir e peramivir, não foi identificada neste estudo.

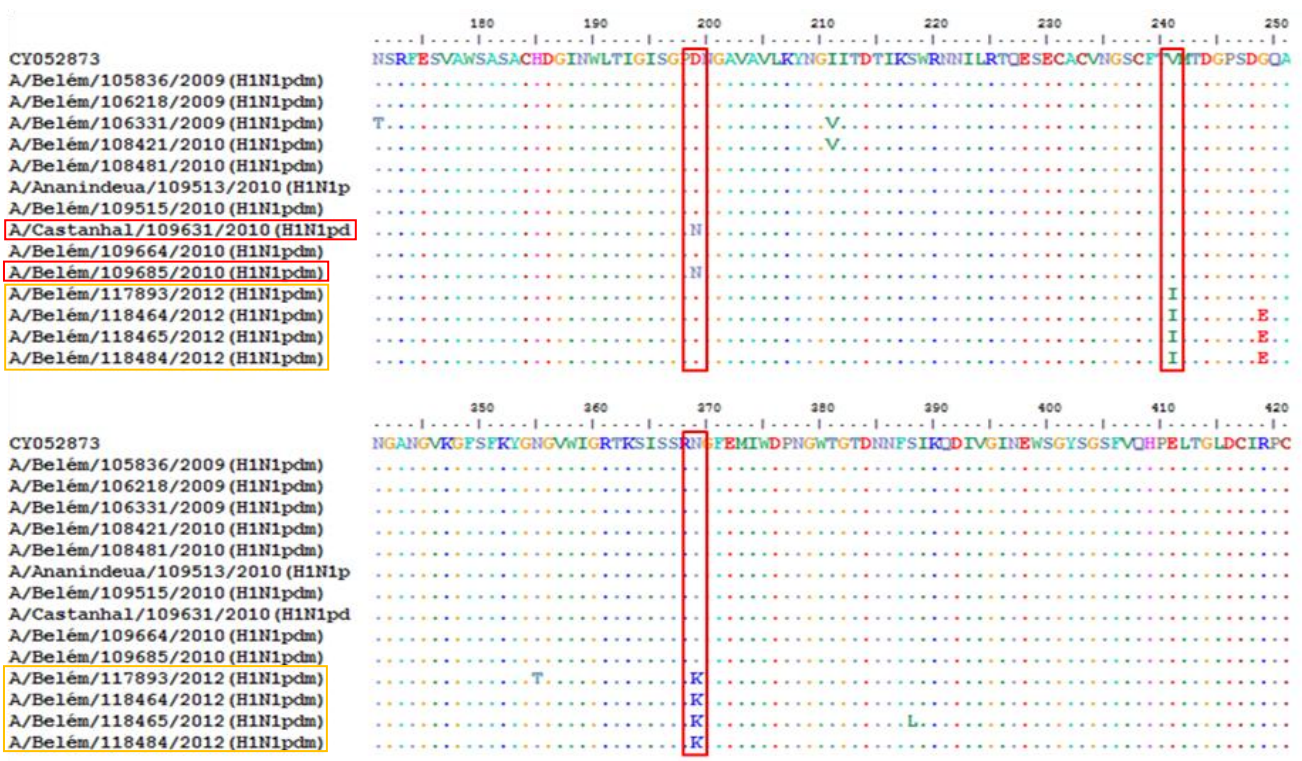


Figura 16: Alinhamento de aminoácidos da NA do vírus *Influenza* H1N1pdm. Em destaque as substituições identificadas.

A modelagem proteica por homologia demonstrou que os moldes do PDB utilizados pelo MODELLER geraram estruturas de boa qualidade estereoquímica, bem como boa compatibilidade da estrutura 3D com a 1D, estes modelos foram validados através do *softwares* PROCHECK e VERIFY 3D (figura 17 e 18).

Na figura 17C, observa-se uma alteração na estrutura conformacional da proteína que resultou em uma mudança na estrutura do sítio ativo que é o local de ligação do oseltamivir, o que poderia estar relacionado com a maior ou melhor afinidade de ligação da NA com o oseltamivir.

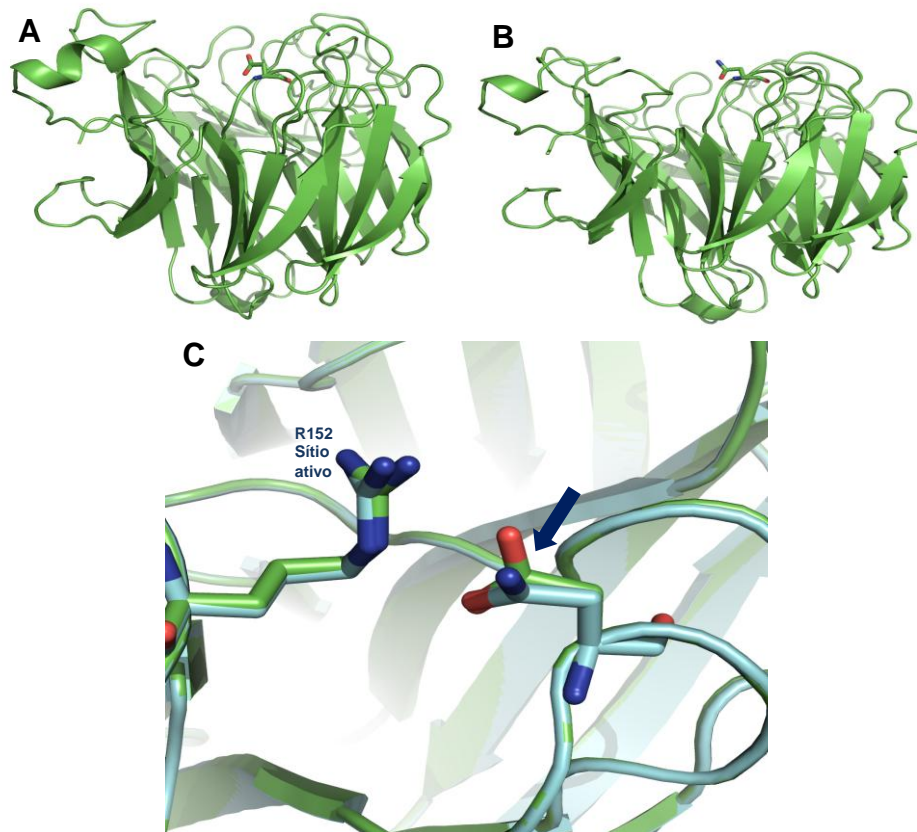


Figura 17: **A)** Modelo 3D da NA selvagem (D199); **B)** Modelo 3D da NA mutante (N199); **C)** Alinhamento dos Modelos 3D D199 (verde) e N199 (azul claro).

Na figura 18 observamos a modelagem das substituições V241I e N369K.

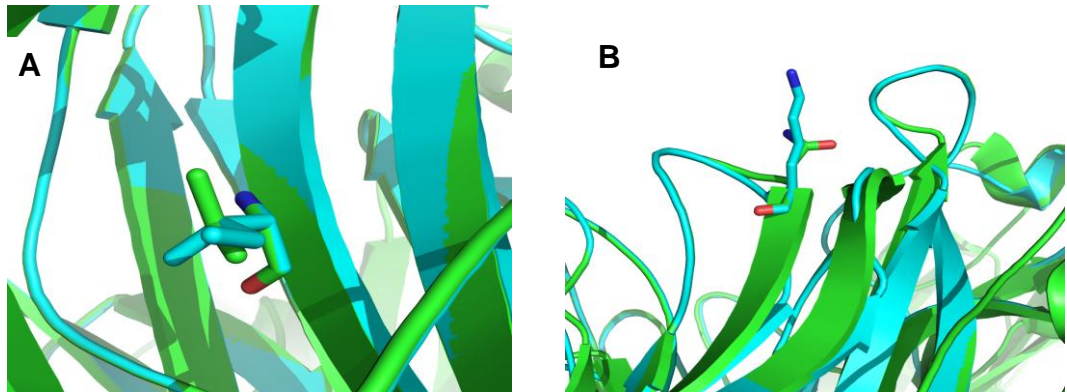


Figura 18: **A)** Alinhamento dos Modelos 3D V241 (verde) e I241 (azul claro); **B)** Alinhamento dos Modelos 3D N369 (verde) e K369 (azul claro).

Das 98 amostras sequenciadas, 40 foram utilizadas na análise filogenética. A neuraminidase é uma proteína bastante conservada, por isso algumas amostras foram retiradas da árvore, pois não apresentavam diferenças entre uma e outra e entre as amostras externas. Não foram observados *clusters* bem definidos, por essa característica da NA de ser bem conservada e haver pouca diferença entre as sequências utilizadas. Porém, verificou-se que as quatro amostras de 2012 formaram um grupo com uma amostra do Rio Grande do Sul e uma da Austrália, evidenciando a evolução viral e o surgimento e acúmulo de substituições aminoacídicas que o vírus H1N1pdm vem adquirindo durante esses três anos de circulação entre humanos (figura 19).

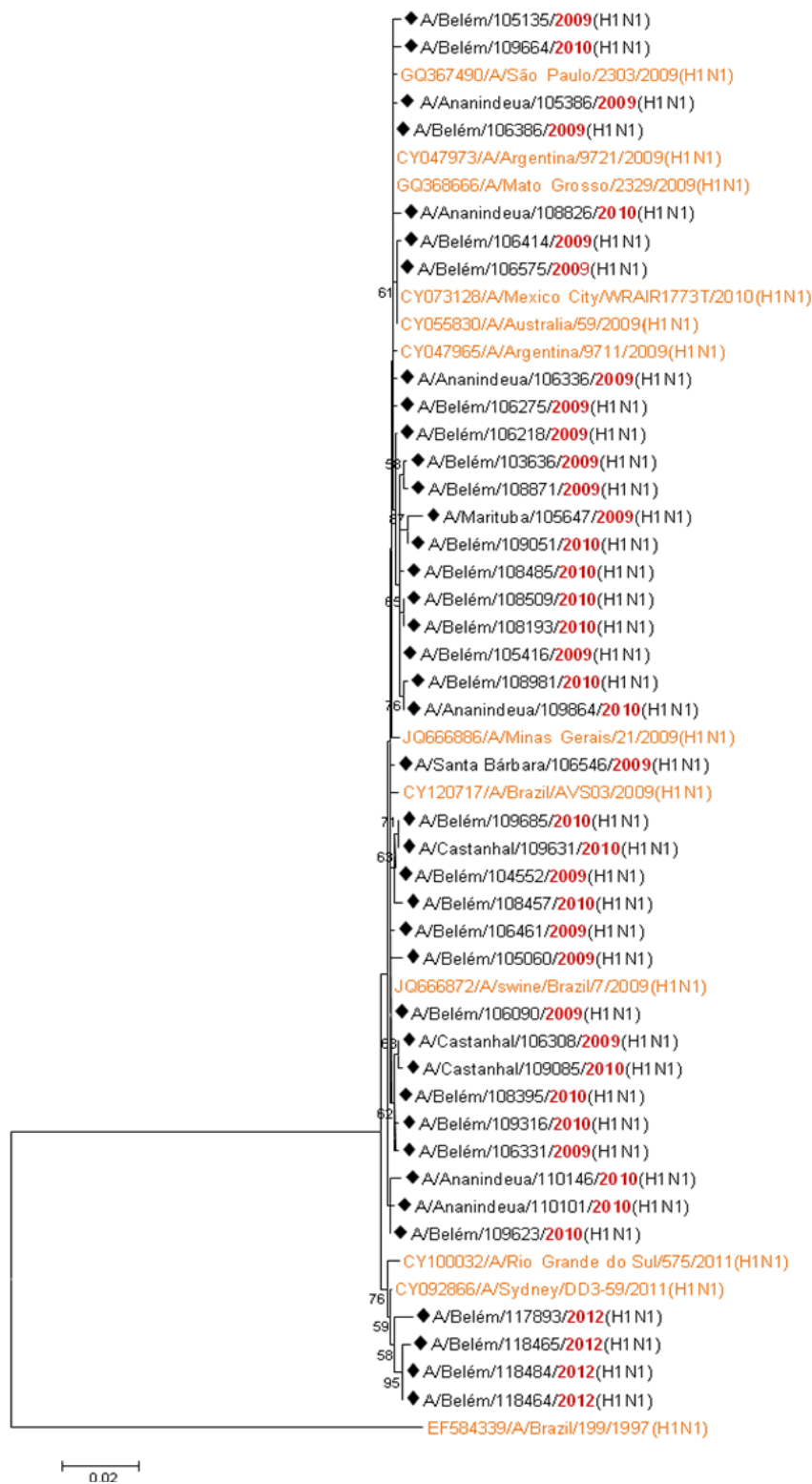


Figura 19: Árvore Filogenética da sequência parcial em nucleotídeos do gene codificador da proteína NA. A cepa EF584339/A/Brasil/199/1997(H1N1) foi utilizada como grupo externo. Valores de Bootstrap (X1000) foram dados para os nós selecionados. A construção da árvore filogenética foi efetuada com a aplicação do método de *neighbor joining* (NJ).

8. DISCUSSÃO

O perfil de resistência dos vírus *Influenza A* aos fármacos antivirais é variável, dependendo da classe antiviral considerada e dos subtipos moleculares virais. Estudos recentes sugerem que alguns casos de resistência podem surgir na dependência da idade ou estado imunológico do indivíduo, além do tempo de uso do medicamento (BAZ et al., 2006; ESHAGHI et al, 2011).

A vigilância da resistência dos vírus *Influenza A* (H1N1) pdm aos antivirais, sobretudo aos inibidores da neuraminidase, é de suma importância, haja vista que estes vírus já são naturalmente resistentes às adamantinas. Os vírus *Influenza A* H1N1 sazonais circulantes atualmente selecionaram a substituição aminoacídica H275Y, a qual confere resistência total ao oseltamivir. Desde 2009, quando o vírus *Influenza A* (H1N1) pdm surgiu, já havia descrição de raras mutações de resistência aos antineuraminidases, especialmente ao oseltamivir (VRIES et al., 2010; WHO, 2011).

Nos últimos anos, vem aumentando a notificação de casos de gripe causada por cepas resistentes aos antineuraminidases. No ano de 2011, a Organização Mundial da Saúde relatou 605 casos de vírus resistentes ao oseltamivir devido à substituição H275Y na NA (WHO, 2011).

Este estudo não evidenciou até o momento, a circulação de cepas com a substituição H275Y. Porém, no Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas foram identificadas três amostras, coletadas em 2012, com a mutação H275Y, que eram provenientes dos estados do Amazonas, Ceará e Rio Grande do Norte (dados não publicados).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm associado outras substituições responsáveis por resistência aos antivirais ou pela diminuição da sensibilidade, sobretudo ao oseltamivir (ESHAGHI et al, 2011; GHEDIN et al., 2011; HURT et al., 2012).

De fato, a substituição D199N em cepas do vírus H1N1 pdm tem sido relatada em vários estudos e tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa. Essa mutação já está associada com um aumento na resistência ao oseltamivir tanto em cepas do vírus H1N1 sazonal como em cepas do vírus H5N1 e a substituição D198N está associada a elevada resistência ao oseltamivir no vírus *Influenza B* (GHEDIN et al., 2011). Em um estudo desenvolvido por Espínola, 2012,

utilizando 1273 sequências de NA, foram identificadas quatro amostras com essa mutação (DAYDE et al., 2010; ESHAGHI et al, 2011; ESPÍNOLA, 2012).

A relevância de novas mutações como a D199N ainda não foi muito bem estabelecida para o H1N1 pdm, necessitando de mais investigações, principalmente estudos fenotípicos de resistência aos inibidores da NA complementando o sequenciamento convencional ou pirosequenciamento (DAYDE et al., 2010; GHEDIN et al., 2011).

Desde o surgimento do vírus *Influenza A H1N1pdm*, algumas mutações têm sido descritas e, em alguns casos, tornaram-se fixas em cepas circulantes globalmente. É o caso das mutações V241I e N369K que surgiram aproximadamente em 2010 e agora estão presentes em cerca de 80% das cepas circulantes do H1N1pdm e estão sendo identificadas em nossas amostras a partir de 2012.

Em um recente estudo, Hurt et al. (2012), investigou o papel dessas mutações (V241I e N369K) como responsáveis para compensar os efeitos negativos causados pela substituição H275Y. Hurt verificou que essas mutações podem recuperar, aproximadamente, 50% da estabilidade da proteína que se perdeu como resultado da mutação H275Y. Variantes com essas mutações têm sido relatadas na América do Norte e no Japão (HURT et al., 2012).

Até o momento, foram relatados casos de resistência do vírus H1N1pdm para o oseltamivir e peramivir; esses vírus permanecem sensíveis ao zanamivir (PIZZORNO et al., 2011).

Neste estudo foi identificada uma mutação que determinou substituições aminoacídicas no H1N1pdm em uma posição que está relacionada com alterações no sítio ativo da NA, o que poderia interferir na interação com os antivirais. O impacto que a pandemia de gripe causou na população mundial em 2009 ressaltou, ainda mais, a importância de monitorar os vírus *Influenza* através da vigilância das cepas circulantes e das mutações no genoma viral que podem associar-se a resistência aos antivirais.

Dessa forma destacamos a importância de um monitoramento contínuo de resistência antiviral e da evolução viral em amostras clínicas, bem como a necessidade de desenvolver novas drogas e estratégias para o controle e manejo clínico da gripe no mundo, principalmente em mutações recém-descobertas. O conhecimento desses dados faz com que os profissionais de saúde possam adotar

estratégias mais eficazes no manejo da doença, em surtos epidêmicos, em eventuais pandemias e no desenvolvimento de novos fármacos anti-influenza, haja vista que a modelagem *in silico* da NA contribui para desvendar os pormenores do funcionamento da enzima, já que a estrutura tridimensional pode elucidar o seu funcionamento na presença do substrato/ fármaco.

9. CONCLUSÃO

- ✓ No presente estudo não identificamos a circulação de cepas H1N1pdm na mesorregião de Belém com a clássica mutação H275Y, que confere alta resistência aos antivirais. Foram identificadas em duas amostras a mutação D199N, a qual tem sido associada a resistência ao oseltamivir
- ✓ A presença da substituição D199N parece alterar a estrutura da proteína NA, o que poderia interferir na ligação do antiviral ao sítio ativo da proteína.
- ✓ Outras substituições foram encontradas (V241I e N369K) e estas tornaram-se fixas em cepas H1N1pdm circulantes no mundo todo.
- ✓ A análise filogenética mostrou que as amostras de 2012 formaram um clade isolado, demonstrando uma variação muito mais temporal do que geográfica das cepas de H1N1pdm.

10. REFERÊNCIAS

AOKI, F. Y.; BOIVIN, G.; ROBERTS, N. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir. **Antiviral Therapy**, v. 12, p. 603-616, 2007.

AYRES, M; AYRES, M.J; AYRES, D.L & SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0** - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq, 2007.

BASLER, C. F.; AGUILAR, P. V. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. **Elsevier: Antiviral Research**, v. 79, p. 166-178, 2008.

BAZ, M.; ABED, Y.; MCDONALD, J.; GUY, B. Characterization of multidrug-resistant influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. **Clinical Infectious Diseases**, n.43, p. 1555–561, 2006.

BOLTZ, D. A.; ALDRIDGEJR, J. R.; WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Drugs in Development for Influenza. **Drugs**, v. 70, n. 11, p. 1349-362, 2010.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde, **NOTA TÉCNICA N.º 15/2010/COVER/CGDT/DEVEP/SVS/MS**. A Organização Mundial da Saúde (OMS) decreta em 10/08/2010 o início da fase pós-pandêmica do vírus Influenza Pandêmico (H1N1) 2009, Brasília: MS, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo para o enfrentamento à pandemia de Influenza Pandêmica (H1N1) 2009: Ações da atenção primária à saúde**, Brasília: MS, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vademecum: sem banalizar nem superestimar, Influenza: aprender e cuidar**, Brasília: MS, p. 1-22, 2009.

BROOKES, M. S.; NÚÑEZ, A.; CHOUDHURY, B.; MATROSOVICH, M.; ESSEN, S. C.; CLIFFORD, D.; SLOMKA, M. J.; KUNTZ-SIMON, G.; GARCON, F.; NASH, B.; HANNA, A.; HEEGAARD, P. M. H.; QUÉGUINER, S.; CHIAPPONI, C.; BUBLLOT, M.; GARCIA, J. M.; GARDNER, R.; FONI, E.; LOEFFEN, W.; LARSEN, L.; REETH, K. V.; BANKS, J.; IRVINE, R. M.; BROWN, I. H. Replication, Pathogenesis and Transmission of Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Non-Immune Pigs. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-9, 2010.

CASS, L. M.; EFTHYMIPOULOS, C.; BYE, A. Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. **Clinical pharmacokinetics**, v. 36, p. 1-11, 1999.

CARR, J.; IVES, J.; KELLY, L. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. **Antiviral Research**, n. 54, p. 79–88, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Updated Interim Recommendations for the Use of Antiviral Medications in the Treatment and Prevention of Influenza for the 2009-2010 Season, 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations.htm>>. Acesso em: 09/02/2012.

CHIN, M. P. S.; CHIN, A. Influenza: The 2009 H1N1 Pandemic And Antiviral Treatment Options. **Webmedcentral**, v. 1, n. 10, p. 1-13, 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**, 2th ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2008. Cap. 9, p. 245-289.

COLMAN, P. M. Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies, and inhibitors. **Protein Science**, v. 3, p. 1687-696, 1994.

CHRISTOPHER, J. V.; QING, L.; YAN, W.; JIANXUN, Q.; MINGYANG, W.; YUE, L.; FENG, G.; JUN, L.; ENGUANG, F.; JIANHUA, H.; JINFANG, W.; HONG, L.; HUALIANG, J.; GEORGE, F. G. Structural and Functional Analysis of Laninamivir and its Octanoate Prodrug Reveals Group Specific Mechanisms for Influenza NA Inhibition. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. 1-10, 2011.

DAHRAN, N. J.; GUBAREVA, L. V.; MEYER, J. J.; OKOMO-ADHIAMBO, M.; MCCLINTON, R. C.; MARSHALL, S. A.; GEORGE, K. S.; EPPERSON, S.; BRAMMER, L.; KLIMOV, A. I.; BRESEE, J. S.; FRY, A. M. Infections With Oseltamivir-Resistant Influenza A (H1N1) in the United States. **JAMA**, v. 301, n. 10, p. 1034-041, 2009.

DAWOOD, F. S.; JAIN, S.; FINELLI, L.; SHAW, M. W.; LINDSTROM, S.; GARTEN, R. J.; GUBAREVA, L. V.; XU, X.; BRIDGES, C. B.; UYEKI, T. M. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 25, p. 2605-615, 2009.

DE JONG, M. D.; BACH, V. C.; PHAN, T. Q.; VO, M. H.; TRAN, T. T.; NGUYEN, B. H.; MARCEL, B.; LE, T. P.; TRUONG, H. K.; NGUYEN, V. V. C.; TRAN, T. H.; DO, Q. H.; JEREMY, F. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 686-691, 2005.

DEYDE, V. M.; SHEU, T. G.; TRUJILLO, A. A.; OKOMO-ADHIAMBO, M.; GARTEN, R.; KLIMOV, A. I.; GUBAREVA, L. V. Detection of Molecular Markers of Drug Resistance in 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses by Pyrosequencing. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1102-110, 2010.

DOUCLETTE, K. E.; AOKI, F. Y. Oseltamivir: a clinical and pharmacological perspective. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 2, n. 10, p. 1671-683, 2001.

ESPÍNOLA, E. E. Genome Stability of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Based on Analysis of Hemagglutinin and Neuraminidase Genes. **The Open Virology Journal**, v. 6, p. 59-63, 2012.

ESHAGHI, A.; Patel, S. N.; Sarabia, A.; Higgins, R. R.; Savchenko, A.; Stojios, P. J.; Li, Y.; Bastien, N.; Alexander, D. C.; Low, D. E.; Gubbay, J. B. Multidrug-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Infection in Immunocompetent Child. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1472-474, 2011.

FOUCHIER, R. A.; MUNSTER, V.; WALLENSTEN, A.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; SMITH, D.; RIMMELZWAAN, G. F.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A. D. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2814-822, 2005.

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**, v. 325, p.197-201, 2009.

GATHERER, D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. **Journal of clinical virology**, v. 45, p.174-178, 2009.

GERDIL, C. The annual production cycle for influenza vaccine. Short communication. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1743-803, 2003.

GHEDIN, E.; LAPLANTE, J.; DEPASSE, J.; WENTWORTH, D.E.; SANTOS, R. P.; LEPOW, M. L.; PORTER, J.; STELLRECHT, K.; LIN, X.; OPERARIO, D.; GRIESEMER, S.; FITCH, A.; HALPIN, R. A.; STOCKWELL, T. B.; SPIRO, D. J.; HOLMES, E. C.; GEORGE, K. S. Deep Sequencing Reveals Mixed Infection with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Strains and the Emergence of Oseltamivir Resistance. **Journal of Infectious Diseases**, n. 203, p. 168-174, 2011.

GUBAREVA, L. V.; KAISER, L.; HAYDEN, F. G. Influenza virus neuraminidase inhibitors. **The Lancet**, v. 355, p. 827-835, 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.

GUBAREVA, L. V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Virus Research**, n. 103, p. 199–203, 2004.

HAYDEN, F. G. Antivirals for Pandemic Influenza. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. S56-61, 1997.

HAYDEN, F. G.; PAVIA, A. T. Antiviral Management of Seasonal and Pandemic Influenza. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. S119-126, 2006.

HAGMAIER, K.; JENNINGS, S.; BUSE, J.; WEBER, F.; KOCHS, G. Novel Gene Product of Thogoto Virus Segment 6 Codes for an Interferon Antagonist. **Journal of Virology**, v. 77, n. 4, p. 2747-752, 2003.

HE, G.; MASSARELLA, J.; WARD, P. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. **Clinical pharmacokinetics**, v. 37, n. 6, p. 471-484, 1999.

HEDLUND, M.; LARSON, J. L.; FANG, F. Antiviral Strategies for Pandemic and Seasonal Influenza. **Viruses**, v. 2, p. 1766-781, 2010.

HIRST, G. K. Adsorption of influenza haemagglutinins and virus by red blood cells. **Journal Experimental Medicine**, v. 76, p. 195-209, 1942.

HURT, A.C.; HOLIEN, J. K.; PARKER, M.; KELSO, A.; BARR, I. G. Zanamivir-Resistant Influenza Viruses with a Novel Neuraminidase Mutation. **Journal of Virology**, v. 83, n. 20, p. 10366-10373, 2009.

HURT, A. C.; HARDIE, K.; WILSON, N. J.; DENG, Y.; OSBOURN, M.; GEHRIG, N.; KELSON, A. Community Transmission of Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 26, p. 2541-542, 2011.

HURT, A. C.; HARDIE, K.; WILSON, N. J.; DENG, Y.; OSBOURN, M.; Leang, S. K.; Lee, R. T. C.; Lannello, P.; Gehrig, N.; Shaw, R.; Wark, P.; Caldwell, N.; Givney, R. C.; Xue, L.; Maurer-Stroh, S.; Dwyer, D. E.; Wang, B.; Smith, D. W.; Levy, A.; Booy, R.; Dixit, R.; Merritt, T.; Kelso, A.; Dalton, C.; . Durrheim, Barr, D.; I. G. Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A (H1N1)pdm09 Influenza in Australia. **Journal of Infectious Diseases**, n. 206, p. 148-157, 2012.

HURT, A. C.; LEANG S. K.; SPEERS D. J.; BARR, I. G.; MAURER-STROH, S. Mutations I117V and I117M and oseltamivir sensitivity of pandemic (H1N1) 2009 viruses. **Emerging Infectious Diseases**, 2012.

International Committee on Taxonomy of Viruses. **Orthomyxoviridae**. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: 23 de Março de 2011.

JACKSON, D.; BARCLAY, W.; ZURCHER, T. Characterisation of recombinant influenza B viruses with key neuraminidase inhibitor resistance mutations. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 55, p. 162-169, 2005.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KISO, M.; TAKAHASHI, K.; SAKAI-TAGAWA, Y.; SHINYA, K.; SAKABE, S.; MAI LE, Q.; OZAWA, M.; FURUTA, Y.; KAWAOKA, Y. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. **PNAS**, v. 107, n. 2, p. 882-887, 2010.

KOLATA, G. Flu: the story of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it. **New York: Farrar, Straus and Giroux**, 1999.

LACKENBY, A.; THOMPSON, C. I.; DEMOCRATIS, J. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. **Current Opinion in Infectious Diseases**, n. 21, p. 626-638, 2008.

LARSON, J. L.; KANG, S.; CHOI, B. I.; HEDLUND, M.; ASCHENBRENNER, L. M.; CECIL, B.; MACHADO, G.; NIEDER, M.; FANG, F. A Safety Evaluation of DAS181, a Sialidase Fusion Protein, in Rodents. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 567-578, 2011.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.

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

LEWIS, D. B. Avian Flu to Human Influenza. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 139-154, 2006.

LOWEN, A. C.; MUBAREKA, S.; STEEL, J.; PALESE, P. Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 1470-476, 2007.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v.356, p. 83-85, 1992.

MANUGUERRA, J. C. & VAN DER WERF, S. Les antiviraux contre la grippe. **Virology**, v. 3, p. 439-52, 1999.

MANUGUERRA, J. C. & VAN DER WERF, S. Les inhibiteurs de neuraminidase: une nouvelle classe d'antiviraux contre la grippe. **Virology**, v. 6, p. 129-138, 2002.

MAURER-STROH, S.; MA, J.; LEE, R. T. C.; SIROTA, F. L.; EISENHABER, F.; Mapping sequence mutations of the 2009 H1N1 Influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites. **Biology Direct**, v. 4, p. 18, 2009.

MC-HARDY, A. C.; ADAMS, B. The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. 1-6, 2009.

MEMOLI, M. J.; DAVIS, A. S.; PROUDFOOT, K.; CHERTOW, D. S.; HRABAL, R. J.; BRISTOL, T.; TAUBENBERGER, J. K. MultiDrug-Resistant 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Maintain Fitness and Transmissibility in Ferrets. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 203, p. 348-357, 2009.

MONTO, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **American Journal of Medicine**, v. 112, Suppl. 1, p. 4-12, 2002.

MOSCANA, A. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 13, p. 1363-373, 2005.

MOSS, R. B.; DAVEY, R. T.; STEIGBIGEL, R. T.; FANG, F. Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1086-093, 2010.

MOSSAD, S. B. The resurgence of swine-origin influenza A (H1N1). **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 76, n. 6, p. 337-343, 2009.

NAFFAKH, N.; RAMEIX-WELTI, M.; WERF, S. V. Chimiothérapies Anti-influenza. **Académie Vétérinaire de France**, v. 161, n. 1, p. 13-17, 2008.

NEUMANN, G. E. KAWAOKA, Y. Host Range Restriction and Pathogenicity in the Context of Influenza Pandemic. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 881-886, 2006.

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

NODA, T.; SAGARA, H.; YEN, A. Architecture of ribonucleo-protein complexes in influenza A virus particles. **Nature**, v. 439, n. 7075, p. 490-492, 2006.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Update on oseltamivir-resistant pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: January**, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2010/wer8506/>. Acessado em: 15/11/2011.

OXFORD, J. S.; LAMBKIN, R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 448-456, 1998.

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. 1647-689.

PIZZORNO, A.; BOUHY, X.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Generation and Characterization of Recombinant Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 25-31, 2011.

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

PROTEIN DATA BANK. **Influenza Neuraminidase: Fighting the flu: atomic structures and the search for drugs and vaccines**. 2009. Disponível em: http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/influenza_neuraminidase.pdf. Acesso em: 012/02/2012.

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

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

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.

SHOPE, R. E. & LEWIS, P. Swine influenza: experimental transmission and pathology. **Journal Experimental Medicine**, n. 54, p. 349–359, 1931.

SMITH, G. J. D.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S. J.; WOROBEY, M.; PYBUS, O. G.; MA, S. K.; CHEUNG, C. L.; RAGHWANI, J.; BHATT, S.; PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; RAMBAUT, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, p. 1122-126, 2009.

SMITH, W.; ANDREWES, C.; LAIDLAW, P. A virus obtained from Influenza patients. **Lancet**, n. 225, p. 66-68, 1933.

SNELL, P.; DAVE, N.; WILSON, K.; ROWELL, L.; WEIL, A.; GALITZ, L.; ROBSON, R. Lack of effect of moderate hepatic impairment on the pharmacokinetics of oral oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate. **British journal of clinical pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 598-601, 2005.

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

TALAVERA, G. A. Influenza: Historia de una enfermedad. **Ver Biomed**, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1999.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, n. 28, p. 2731-2739, 2011.

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. 1829-839, 2001.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, n. 1, p. 15-22, 2006.

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.; HIGGINS, D.G. AND GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994.

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D. A. A.; CHEN, L.; RECUENCO, S.; ELLISON, J. A.; DAVIS, C. T.; YORK, I. A.; TURMELLE, A. S.; MORAN, D.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M. R.; TANG, K.; ROWE, L. A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K. A.; COX, N. J.; ANDERSON, L. J.; RUPPRECHT, C. E.; DONIS, R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **PNAS**, p. 1-6, 2012.

TRIANA-BALTZER, G. B.; GUBAREVA, L. V.; KLIMOV, A. I.; WURTMAN, D. F.; MOSS, R. B.; HEDLUND, M.; LARSON, J. L.; BELSHE, R. B.; FANG, F. Inhibition of Neuraminidase Inhibitor-resistant Influenza Virus by DAS181, a Novel Sialidase Fusion Protein. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. 1-9, 2009a.

TRIANA-BALTZER, G. B.; GUBAREVA, L. V.; NICHOLLS, J. M.; PEARCE, M. B.; MISHIN, V. P.; BELSER, J. A.; CHEN, L.; CHAN, R. W. Y.; CHAN, M. C. W.; HEDLUND, M.; LARSON, J. L.; MOSS, R. B.; KATZ, J. M.; TUMPEY, T. M.; FANG, F. Novel Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Are Potently Inhibited by DAS181, a Sialidase Fusion Protein. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. 1-8, 2009b.

TRIANA-BALTZER, G. B.; BABIZKI, M.; CHAN, M. C. W.; WONG, A. C.; ASCHENBRENNER, L. M.; CAMPBELL, E. R.; LI, Q.; CHAN, R. W. Y.; PEIRIS, J. S. M.; NICHOLLS, J. M.; FANG, F. DAS181, a sialidase fusion protein, protects human airway epithelium against influenza virus infection: an *in vitro* pharmacodynamic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 275-284, 2010.

TURNER, S. J.; DOHERTY, P. C.; KELSO, A. Q&A: H1N1 pandemic influenza - what's new?. **BMC Biology**, v. 8, n. 130, p. 1-6, 2010.

VALDEZ, A. R. Pandemia de gripe Sinaloa, 1918-1919. In: **Elementos: Ciencia y Cultura**, v. 9, n. 47, p. 37-43, 2002.

VÉLEZ, H. S. Influenza: actualización de conceptos. **IETREIA**, v.15, n. 4, p. 233-241, 2002.

VIJAYKRISHNA, D.; POON, L. L. M.; ZHU, H. C.; MA, S. K.; LI, O. T. W.; CHEUNG, C. L. ; SMITH, G. J. D.; PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y. Reassortment of Pandemic H1N1/2009 Influenza A Virus in Swine. **SCIENCE**, v. 328, p. 1529, 2010.

VRIES, E. V. D.; STELMA, F. F.; BOUCHER, C. A. B. Emergence of a Multidrug Resistant Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 14, p. 1381-382, 2010.

WEBSTER'S ONLINE DICTIONARY. Disponível em: < <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Influenza> >. Acesso em: 22/02/2012.

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.

WEINSTOCK, D. M.; ZUCCOTTI, G. The Evolution of Influenza Resistance and Treatment. **JAMA**, v. 301, n. 10, p. 1066-069, 2009.

WHO. Global monitoring of antiviral resistance in currently circulating human influenza viruses, November 2011. **Weekly epidemiological Record**, n. 86, p. 497–508, 2011.

WIGG, M. D. Antivirais. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**, 2th ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2008. Cap. 5, p. 117-146.

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. 1691-738.

YEN, H-L.; HOFFMANN, E.; TAYLOR, G. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. **Journal of Virology**, v. 80, p. 8787-8795, 2006.

YU, H.; ZHANG, P.; ZHOU, Y.; LI, G.; PAN, J.; YAN, L.; SHI, X.; LIU, H.; TONG, G. Isolation and genetic characterization of avian-like H1N1 and novel reassortant H1N2 influenza viruses from pigs in China. **Elsevier: Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 386, p. 278-283, 2009.

ZAMBON, M. C. The pathogenesis of influenza in humans. **Reviews in Medical Virology**, n. 11, p. 227-241, 2001.

ZHANG, L.; Katz, J. M.; Gwinn, M.; Dowling, N. F.; Khoury, M. J. Systems-based candidate genes for human response to Influenza infection. **Elsevier: Infection, Genetics and Evolution**, n. 9, p.1148–157, 2009.

ZURCHER, T.; YATES, P. J.; DALY, J. Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 58, p. 723-732, 2006.

11. ANEXO



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:** Nº016/2010-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.