

BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia
Prof. Armando Ventura
Apostila de Virologia

Influenza

Os vírus respiratórios estão entre os maiores causadores de doenças que afligem os seres humanos e constantemente nos ameaçam com epidemias de amplo espectro. Dentre eles, sem dúvida o vírus da influenza é o que tem provocado maior número de vítimas fatais. Historicamente o vírus da influenza deixou uma marca indelével, que foi a pandemia (epidemia mundial) de 1918-1919, com mais de 20 milhões de mortes (**Fig1**). Até hoje ainda são produzidos documentos sobre os impactos psicológicos e sociais desse episódio. Diante dessa ameaça, uma rede mundial de laboratórios é mantida para detectar o mais rápido possível, o aparecimento de cepas com patogenicidade exacerbada. Muito provavelmente em nossas vidas ainda ouviremos falar algumas vezes do surgimento de uma dessas cepas, e correremos aos postos de saúde para tomar a dose da “vacina do ano”. Anualmente a Influenza causa 3 a 5 milhões de casos graves de doença respiratória em humanos no mundo, provocando cerca de 500.000 mortes.



Fig. 1. Hospital de campo, improvisado para atender ao grande número de pacientes nos EUA, e enfermeiras suecas voluntárias durante a pandemia de 1918-19.

Classificação e propriedades

Os vírus da influenza formam a família Orthomixoviridae, subdividida nos tipos: influenza A, B e C. Esses vírus possuem genoma de RNA de polaridade negativa segmentado, e suas partículas são envelopadas. À **Fig2** temos duas micrografias eletrônicas, sendo que na primeira (aumento maior), numa tomada feliz, é possível observar no interior da partícula alguns dos segmentos do nucleocapsídeo, que apresentam a simetria helicoidal típica. Na superfície das partículas virais, o envelope, apresenta espículas, e sua morfologia é variada (pleiomórficos) ficando entre 80 e 120 nm.

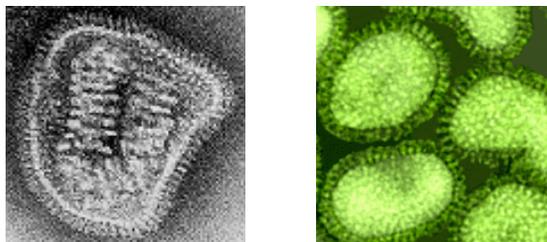


Fig. 2.

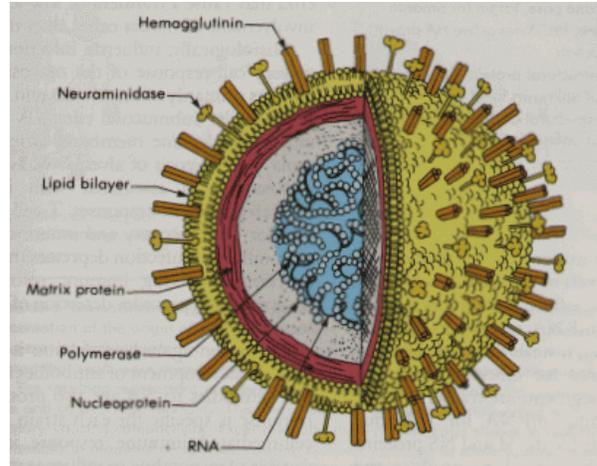


Fig. 3.

À **Fig. 3** temos um esquema da partícula viral, onde estão representadas as proteínas estruturais majoritárias. Os oito segmentos presentes na partícula viral que codificam dez proteínas, estão descritos à **tabela 1**, sendo seu tamanho decrescente do 1 (2.341 bases) para o 8 (890 bases). A influenza do tipo A apresenta alta variabilidade e alta taxa de recombinação, a do tipo B variação moderada, e a do tipo C é estável. A distinção entre os tipos se dá através da caracterização sorológica das proteínas de Matriz (M1) e da Nucleoproteína (N). As proteínas, **hemaglutinina (HA)** e **neuraminidase (NA)**, presentes no envelope, que constituem as espículas visíveis à microscopia eletrônica (**Fig 2**), têm papel fundamental na multiplicação e patogênese desses vírus.

Tabela 1. Genes expressos pelos diferentes segmentos do genoma da Influenza.

Segmento	Gene	Pares de bases	Número de unidades no vírion	Peso Molecular (Kd)	Função
1	PB2	2341	30-60	96	Subunidade da RNA pol.
2	PB1	2341	30-60	87	Subunidade da RNA pol.
3	PA	2233	30-60	85	Subunidade da RNA pol.
4	HA	1778	500	75	Hemaglutinina
5	NP	1565	1000	56	Nucleoproteína (associa-se ao RNA)
6	NA	1413	100	56	Neuraminidase
7	M1	1027	3000	28	Proteína da Matriz (organiza a partícula interagindo com o nucleocapsídeo e o envelope)
	M2		poucas	15	Proteína de Membrana (forma canais e participa do desnudamento, é alvo da droga amantadina)
8	NS1	890	0	26	Não estrutural (inibe a resposta antiviral mediada por interferon)
	NS2		0	14	Não estrutural (envolvida na saída dos nucleocapsídeos do núcleo)

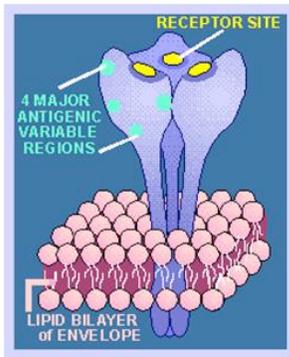


Fig. 4. HA

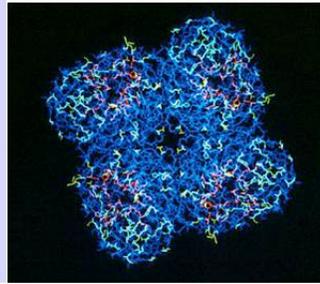
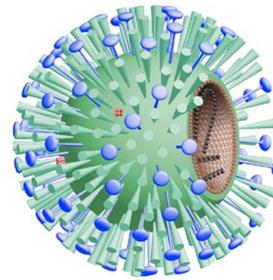


Fig. 5. NA
(vista superior do tetrâmero)



red: M2 protein
green: Haemagglutinin
blue: Neuraminidase
inside: viral RNA

Fig. 6

Para os Influenza A humanos há 15 sorotipos conhecidos de hemaglutinina e 9 de neuraminidase, e assim, HA e NA podem variar e dão as principais características antigênicas das cepas. A nomenclatura é feita indicando o tipo, o local, mês e ano de isolamento, e as variantes de HA e NA, como por exemplo: A/Pequim/10/57 (H2N2). À **Fig. 4** temos um esquema do trîmero de HA com a indicação do sítio aonde se liga o receptor, e pontos de maior variabilidade antigênica. À **Fig. 5** temos uma representação da estrutura tridimensional do tetrâmero de NA, vista de cima onde estão os sítios ativos da neuraminidase. À **Fig. 6**, temos uma representação que leva em conta a frequência com que cada uma das proteínas de envelope aparece na superfície da partícula viral. Deve ser ressaltado que há uma interação entre M1 (Matrix no esquema da Fig 3) e a porção intra-envelope de HA e NA; e também entre M1 e o complexo do nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo é composto pelo RNA associado a NP (nucleoproteína) e aos três polipeptídeos da RNA polimerase RNA-dependente (PA, PB1 e PB2), Fig 3 e tabela 1.

Replicação.

A ligação do vírus influenza às células alvo no epitélio respiratório se dá pela interação entre HA e estruturas de ácido neuramínico presentes nas glicoproteínas da membrana celular. Após a endocitose, o pH ácido do endossomo promove uma mudança do pH interno da partícula graças à permeabilidade a H⁺ possível pela presença de M2 no envelope (Figs 6 e 7) que forma canais seletivos. A acidificação provoca uma mudança estrutural na HA, que leva à fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando os nucleocapsídeos de sua interação com M1 e deixando-os soltos no citoplasma **Fig. 7**. Após a migração dos nucleocapsídeos virais para o núcleo celular, que é uma característica dos ortomixovírus (os demais vírus RNA fita simples negativa fazem a multiplicação exclusivamente no citoplasma), os diversos segmentos são transcritos pela RNA polimerase RNA-dependente (RpRd). Outra característica única é de que a polimerase viral utiliza a porção 5' dos mRNAs celulares. Dessa forma os mRNAs virais saem do núcleo celular contendo a porção 5' *cap* "roubada dos mRNAs celulares" e uma cauda poliA inserida pela própria RpRd, sendo traduzidos em seguida. HA e NA sofrem as modificações pós-tradução (ex: glicosilação) ao nível do retículo endoplasmático e são transportadas pelo complexo de Golgi para a membrana celular. A elas, através de sua porção intracitoplasmática associa-se a proteína M1.

As subunidades componentes da polimerase viral (PB1, PB2 e PA) além de NP migram para o núcleo (possuem sinal de localização nuclear), aonde irão formar novos nucleocapsídeos associando-se às novas cópias de genoma RNA⁻. Estas foram feitas utilizando como molde cópias RNA⁺ do genoma original (diferentes dos mensageiros pois não possuem 5'CAP e poliA). Os nucleocapsídeos completos migram para fora do núcleo celular e dirigem-se aos pontos da membrana citoplasmática onde estão concentrados complexos M1/NA/HA. A interação do nucleocapsídeo com M1 na face intracitoplasmática da membrana celular leva ao brotamento das

partículas virais completas. Os nucleocapsídeos são incorporados sem uma seleção rigorosa, gerando partículas com 11 segmentos em média, e muitas delas defectivas, pois pode faltar um ou mais segmentos, dos oito necessários, dentre os incorporados (Fig. 7). No momento da saída dos vírus das células do epitélio do aparelho respiratório a atividade neuraminidase cliva o ácido neuramínico, liberando as partículas virais da retenção por uma possível interação entre ácido neuramínico presente no muco e a hemaglutinina.

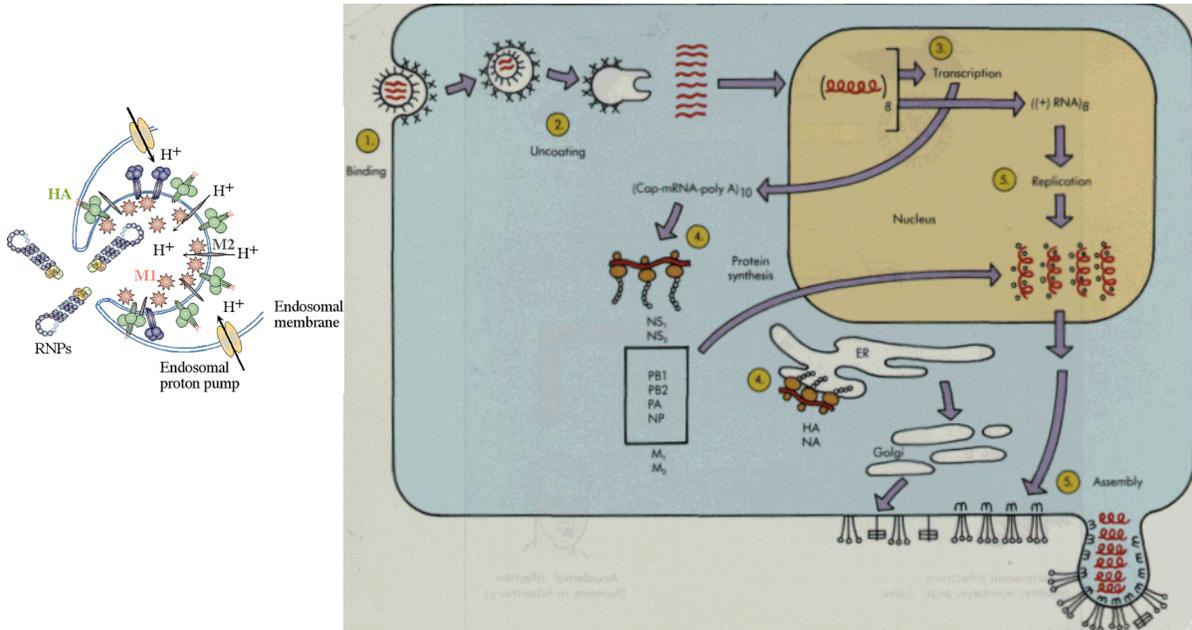


Fig. 7.

Patogenia e transmissão

Os vírus da Influenza estabelecem sua infecção nas vias aéreas superiores ou inferiores (brônquios e alvéolos pulmonares), tendo com alvo as células epiteliais (secretoras de muco, ciliadas, e outras). A NA cliva os resíduos do ácido neuramínico participante dos polímeros componentes do muco, abrindo o caminho até o epitélio. A incubação, com a conseqüente destruição do epitélio atingido, é rápida (2 a 3 dias), levando à deficiência respiratória (sintomatologia local). Os sintomas sistêmicos (febre, mal estar, cefaléia e dores musculares) estão ligados à indução do interferon gama e outras citocinas. Nesse epitélio destruído pode haver o estabelecimento de infecções secundárias por bactérias e outros vírus. Dependendo da extensão dessa destruição, ocorre a síndrome da Influenza, que é letal. A gravidade da doença depende da cepa do vírus, entretanto, sua evolução é normalmente benigna com a recuperação entre dois e cinco dias após as manifestações clínicas. A transmissão ocorre de forma muito eficiente e rápida, principalmente em ambientes fechados, através de gotículas dispersas pela via respiratória que carregam muco contaminado, de um indivíduo ao outro.

Epidemiologia e variabilidade

A ocorrência do vírus da influenza (tipos A e B) é mundial, sendo mais freqüente no inverno. Esses vírus infectam aves e mamíferos, podendo fazer infecções cruzadas. Esses eventos são mais prováveis em regiões rurais densamente povoadas **Fig. 8**.

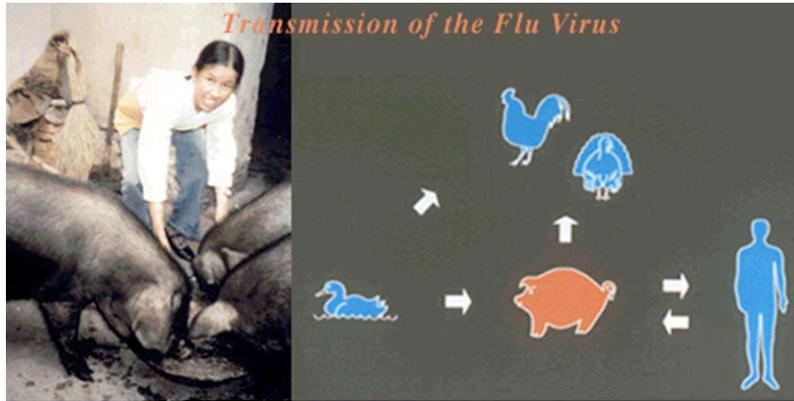


Fig. 8.

Quando levamos em conta o seu mecanismo de replicação, temos a possibilidade de que duas cepas do vírus **influenza A** de diferentes espécies entrem numa mesma célula. No momento do brotamento, como não há mecanismo rigoroso de seleção, pode haver o empacotamento de segmentos genômicos de ambas as cepas numa mesma partícula viral (**Fig. 9**). Esse fenômeno pode gerar um vírus inócuo ou combinar características de ambos levando a uma maior patogenicidade, o que é determinado principalmente por novas combinações entre diferentes HA e NA. A esse processo, que provoca uma mutação drástica, dá-se o nome de **desvio antigênico**, sendo também chamado rearranjo, deslocamento ou reagrupamento. O outro processo, que contribui para a constante modificação desses vírus (ocorre com influenzas A e B), origina-se das mutações introduzidas durante a replicação do genoma pela RNA polimerase RNA-dependente, é chamado de **flutuação antigênica** (**Fig. 9**).

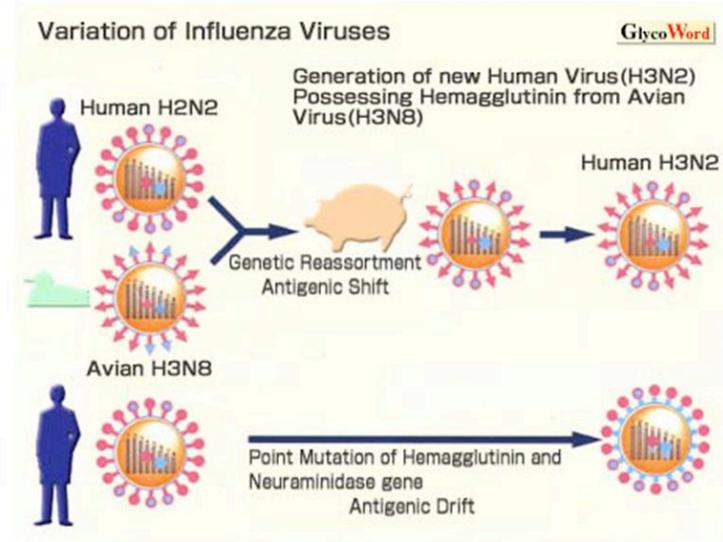


Fig. 9.

O sinergismo desses dois mecanismos de variabilidade, aliado às demais características do vírus da **influenza A**, explica a ocorrência de epidemias de grande porte de forma periódica. Assim, o resgate de amostras, até onde foi possível, permite traçar a evolução desses vírus em termos das combinações de HA e NA:

1874 --- (H3N8)	
1890 --- (H2N2)	Pandemia
1902 --- (H3N2)	
1918 --- (H1N1).....	Gripe “Espanhola”, pandemia
1933 --- (H1N1).....	Isolamento das primeiras cepas
1947 --- (H1N1).....	Detecção da variabilidade
1957 --- (H2N2).....	Gripe “Asiática”, pandemia
1968 --- (H3N2).....	Gripe de “Hong Kong”, pandemia
1976 --- (H1N1).....	Gripe “Suína”, não epidêmica
1977 --- (H1N1) + (H3N2).....	Gripe “Russa” epidêmica
2005 --- (H5N1).....	Gripe aviária, epidêmica, algumas fatalidades em humanos
2009 --- (H1N1).....	Gripe suína, pandêmica, milhares de mortes

Os programas de vigilância epidemiológica detectam várias cepas de influenza circulantes como: H7N3, H5N2, H5N3, H7N7, H10N7 (provocou casos em humanos) e H7N2. Informações atualizadas sobre os vírus Influenza em circulação podem ser obtidas nos sites www.who.int e www.cdc.gov.

Diagnóstico, prevenção e tratamento

O diagnóstico laboratorial pode ser feito pela detecção do vírus em cultura celular. Como ocorre a expressão de HA na superfície das células infectadas pode-se testar a hemadsorção à cultura celular. Outra forma de verificar se partículas de influenza estão presentes em grande quantidade nas secreções, é através da **hemaglutinação**. Essa mesma propriedade pode ser utilizada para a detecção de anticorpos, com a reação de inibição da hemaglutinação. A imunofluorescência e o teste de ELISA para detecção de anticorpos, e mais recentemente a transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) para detecção do genoma, também são utilizados no diagnóstico.

Em caso de epidemia grave, deve-se recorrer ao isolamento dos pacientes. A prevenção é feita, normalmente, com **vacinas** produzidas a partir de vírus cultivados em ovos embrionados, e inativada com formol **Fig. 10**. Há uma versão de vacina fracionada, fazendo-se uma etapa adicional para purificação de HA e NA. Esta é mais efetiva e provoca menos efeitos colaterais, porém seu custo é bem mais elevado limitando a produção em larga escala. Há também uma vacina de DNA expressando NP em teste. As formulações vacinais normalmente são compostas de três cepas (duas As e uma B) como por exemplo: A/Fujian/411/2002 (H3N2), A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) e B/Hong Kong/330/2001. A vacinação leva a detecção de anticorpos protetores em 1-2 semanas, um nível máximo de anticorpos séricos em 4-6 semanas, e uma queda para 1/2 do nível máximo de anticorpos séricos em 6 meses. A duração da imunidade é de 1 ano com eficácia de 70 a 90 %.



Fig. 10.

Há vários pontos do ciclo replicativo do vírus influenza vulneráveis, podendo ser alvos do desenvolvimento de estratégias terapêuticas **Fig. 11**. Os primeiros medicamentos com comprovada eficácia contra influenza foram a amantadina e a rimantadina. Seu alvo é a proteína de envelope M2 (**Fig. 12**), que durante a infecção é responsável pela mudança de pH no interior da partícula viral, quando esta está englobada no fagossomo. Com o bloqueio dos canais formados por M2, a mudança estrutural induzida na hemaglutinina não ocorre, impedindo a fusão e a liberação dos nucleocapsídeos. As drogas mais recentes foram desenvolvidas de forma planejada ao nível molecular, após a elucidação da estrutura tridimensional da neuraminidase (Fig 5). Com o bloqueio de NA por essas drogas, zanamivir ou oseltamivir, que demonstraram eficiência em testes clínicos, o vírus não consegue quebrar os resíduos de ácido neurâmínico e se libertar do muco (**Fig. 13**).

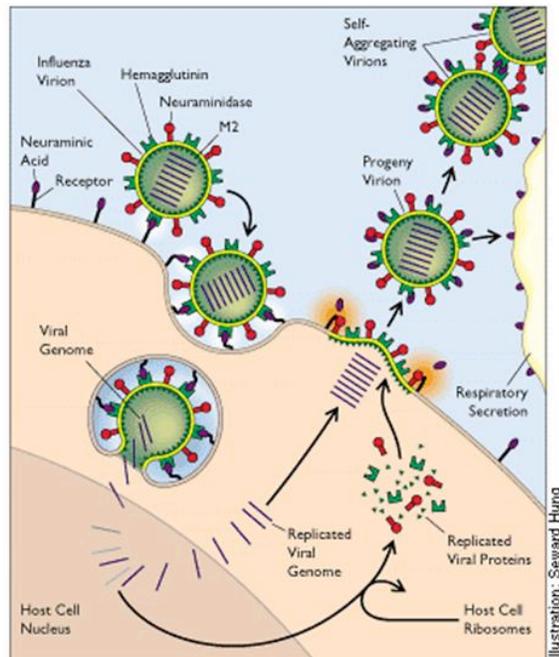


Figure 2. Replicative cycle of an influenza virus offers multiple targets for antiviral drugs. The pathogen enters host cells via the binding of a coat glycoprotein, hemagglutinin, to cell-surface receptors that end in neuraminic acid. Within the cell, the viral genome (eight RNA strands) replicates both itself and all viral proteins. Back at the cell surface, progeny virions self-assemble. They bud from the cell via neuraminidase-mediated cleavage of the same receptor types with which hemagglutinin had interacted. Outside the cell, neuraminidase remains essential to free the virus from neuraminic-acid residues on respiratory secretions and on other virions. Accordingly, neuraminidase inhibitors—the newest antivirals—act by leaving flu virions stuck to cell surfaces, to respiratory secretions, and to each other. Earlier drugs had targeted the M2 viral coat protein of influenza A.

Fig.11.

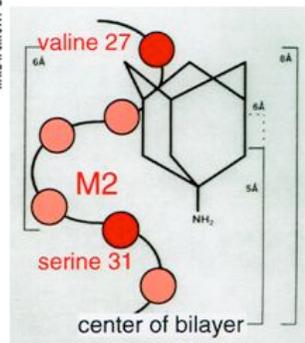


Fig. 12. Amantadina.
Aminoácidos alvo de M2 indicados.

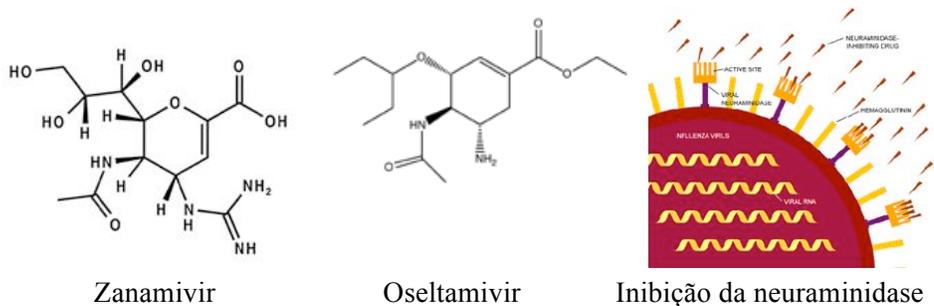


Fig. 13.

Pesquisas mostraram inicialmente o vírus AH1N1 (2009) sensível aos compostos zanamivir (vendido com o nome comercial de Relenza) e oseltamivir (Tamiflu). No entanto, a efetividade desses medicamentos mostrou-se não ser absoluta contra os vírus isolados em laboratórios de pesquisa, ou seja, há variantes resistentes.

Quanto à prevenção, sempre que estiver em período de tratamento, um paciente deve lavar bem as mãos, tossir ou espirrar em seu antebraço (pois as mãos são uma forte fonte de contágio), e usar máscaras cirúrgicas para auxiliar na contenção do contágio (as máscaras apenas evitam que a atmosfera de gotículas com vírus proveniente da respiração atinja uma área maior).

Finalmente, devemos ressaltar que a capacidade de produção de vacinas é limitada, e não faria frente a uma pandemia de rápida expansão. Felizmente a patogênese causada pelo A H1N1 de 2009 acabou posteriormente à expansão epidêmica inicial, não se mostrando significativamente mais grave do que a das outras cepas circulantes.