

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

**Influenza**

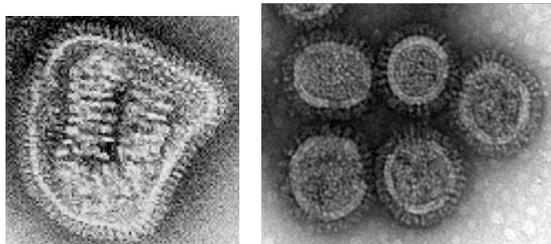
Os vírus respiratórios estão entre os maiores causadores de doenças que afligem os seres humanos e constantemente nos ameaçam com epidemias de amplo espectro. Dentre eles, sem dúvida o vírus da influenza é o que tem provocado maior número de vítimas fatais. Historicamente o vírus da influenza deixou 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.



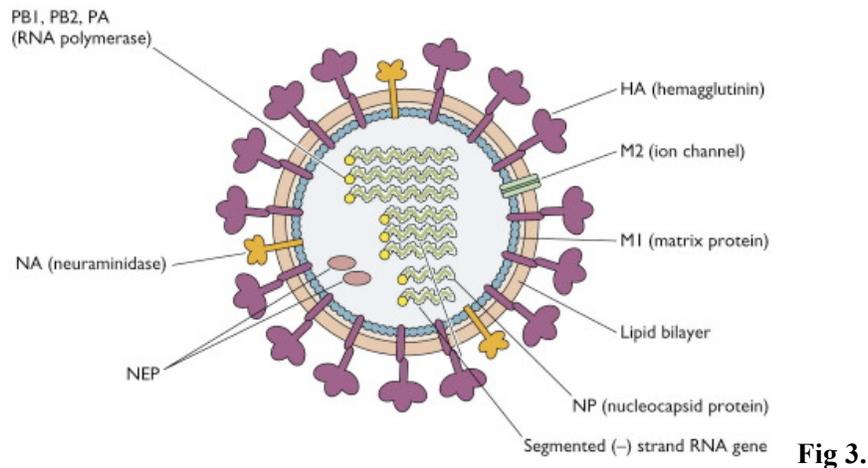
**Fig 1.** Hospital de campo, improvisado para atender ao grande número de pacientes nos EUA, e enfermeiras suecas voluntárias durante a pandemia de 1918-19.

**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 **Fig 2** temos duas micrografias eletrônicas, sendo que na da esquerda (aumento maior), 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.



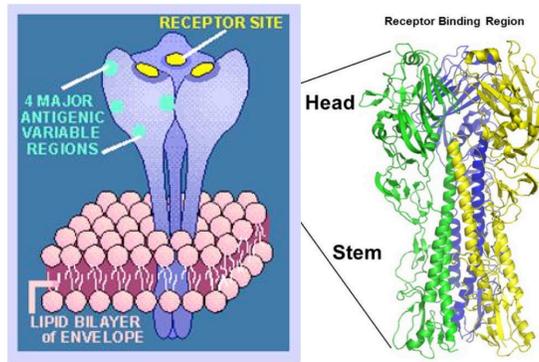
**Fig 2.**



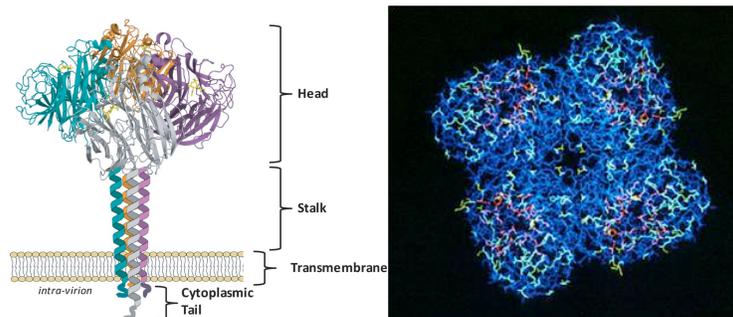
À **Fig 3** temos um esquema da partícula viral, onde estão representadas as proteínas estruturais majoritárias. Os oito segmentos presentes na partícula viral que codificam dez proteínas, estão descritos à **tabela 1**, sendo seu tamanho decrescente do 1 (2.341 bases) para o 8 (890 bases). A influenza 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, **hemagglutinaína (HA)** e **neuraminidase (NA)**, presentes no envelope e 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	Hemagglutinaína
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, interage com os nucleocapsídeos e com 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		poucas	14	Não estrutural (envolvida na saída dos nucleocapsídeos do núcleo, NEP)



**Fig 4. HA**



**Fig 5. NA. Vistas lateral e superior do tetrâmero**

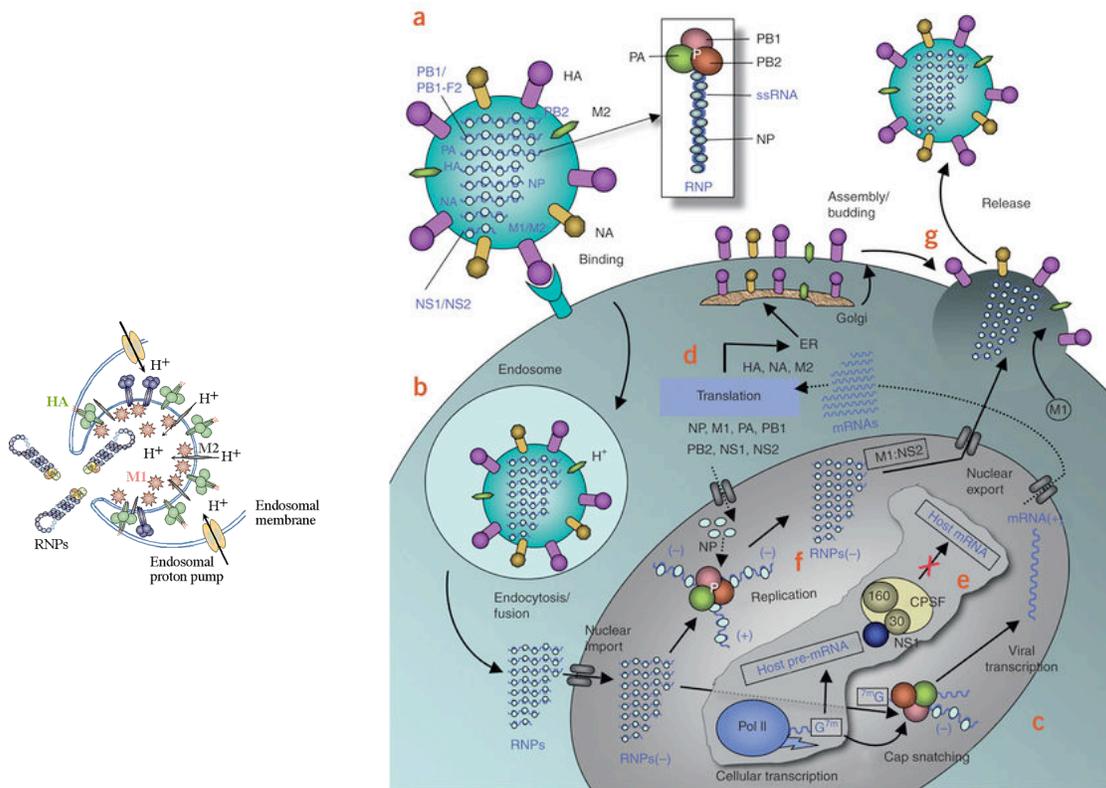
Para os Influenza A humanos há pelo menos 15 sorotipos de hemaglutinina e 9 de neuraminidase, e assim, HA e NA podem variar e dão as principais características antigênicas das cepas. A nomenclatura é feita indicando o tipo, o local, mês e ano de isolamento, e as variantes de HA e NA, como por exemplo: A/Pequim/10/57 (H2N2). À **Fig 4** (esquerda) temos um esquema do trîmero de HA com a indicação do sítio aonde se liga o receptor, e pontos de maior variabilidade antigênica. À direita a representação da estrutura resolvida desse trîmero em que são destacadas as regiões da cabeça e talo. À **Fig 5** temos uma representação da estrutura tridimensional do tetrâmero de NA com a indicação de que a estrutura da região da cabeça (ou globular) foi resolvida (à esquerda), e essa região vista de cima (à direita) onde estão os sítios ativos da neuraminidase. 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 os nucleocapsídeos. 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 (Fig 6). 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 (Fig 6, inserto à esquerda). 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 6**). Após a migração dos nucleocapsídeos virais (RNPs) 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) formada por PA, PB1 e PB2. Outra característica única é de que a RpRd do Influenza 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" (*CAP snatching*) e uma cauda poliA inserida pela própria RpRd, sendo traduzidos em seguida. HA, NA e M2 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 (**Fig 6**).

As subunidades componentes da polimerase viral (PB1, PB2 e PA) além de NP, NS1e NS2 (NEP da Fig 3) 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, sendo diferentes dos mensageiros pois não possuem 5'CAP e poliA (Replication na Fig 6). Os nucleocapsídeos completos associados a M1, migram para fora do núcleo celular com a intermediação de NS2 (NEP, Nucleocapsid Export Protein), e dirigem-se aos pontos da membrana citoplasmática onde estão concentrados complexos M1/NA/HA. A interação do nucleocapsídeo/M1, com HA/NA na face intracitoplasmática da membrana celular leva ao brotamento das partículas virais (**Fig 6**). 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. No momento da saída dos vírus das células do epitélio do aparelho respiratório a atividade neuraminidase de NA cliva o ácido neuramínico, liberando as partículas virais da retenção por uma possível interação entre ácido neuramínico presente no muco e a HA.



**Fig 6.**

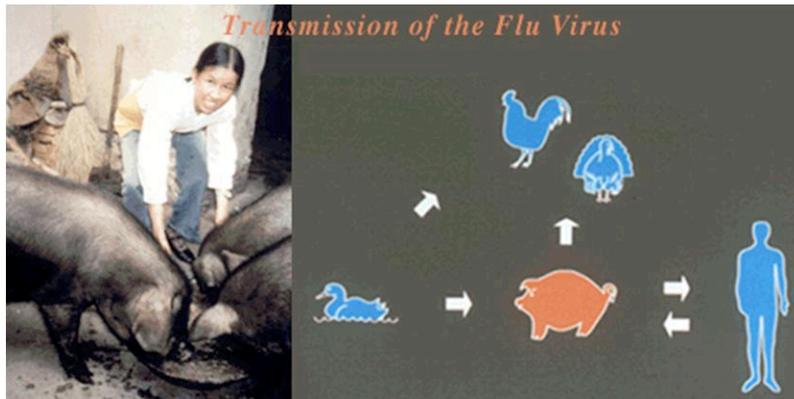
## Patogenia e transmissão

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 de 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.

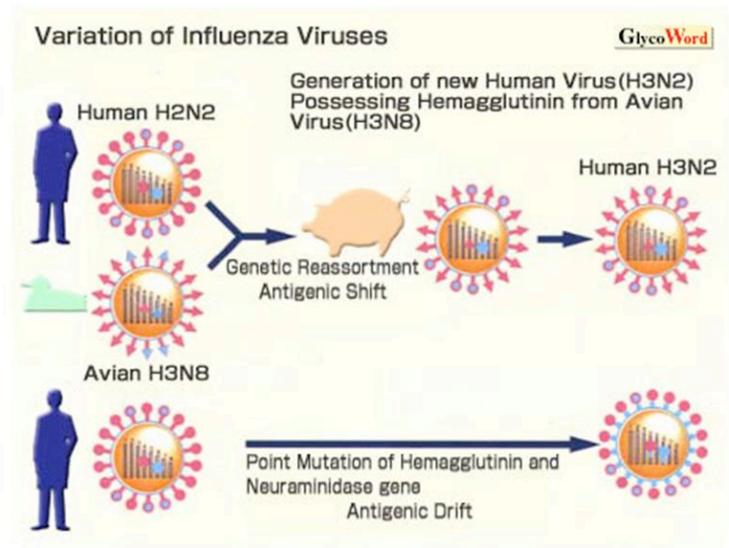
### Epidemiologia e variabilidade

A ocorrência dos 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 7**.



**Fig 7.**

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 8**). 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 (Shift, Fig 8)**, 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 (Drift, Fig 8)**.



**Fig 8.**

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).....	<b>Gripe suína, pandêmica, milhares de mortes</b>

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](http://www.who.int) e [www.cdc.gov](http://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

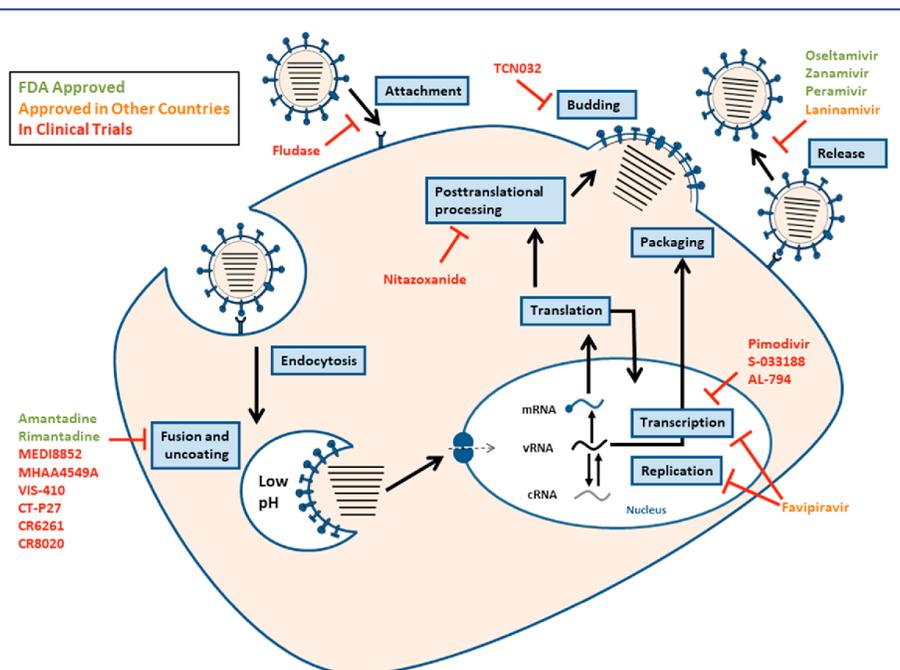
o teste de ELISA para detecção de anticorpos, e mais recentemente a transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) para detecção do genoma, também são utilizados no diagnóstico.

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 9**. 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 %.

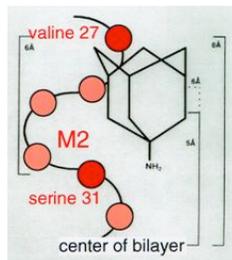


**Fig 9.**

Há vários pontos do ciclo replicativo do vírus influenza vulneráveis, podendo ser alvos do desenvolvimento de estratégias terapêuticas **Fig 10**. Os primeiros medicamentos com comprovada eficácia contra influenza foram a amantadina e a rimantadina. Seu alvo é a proteína de envelope M2 (**Fig 11**), 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.

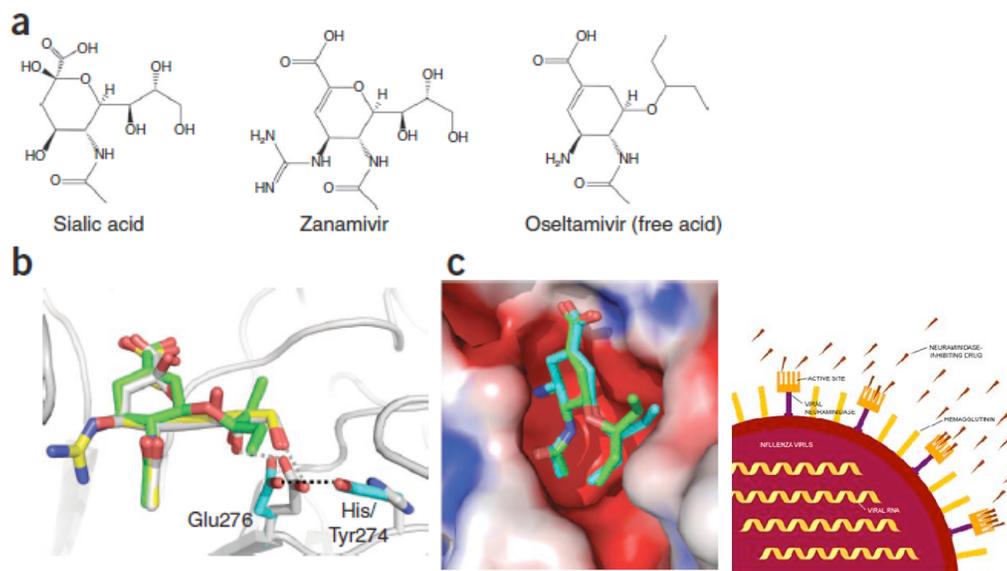


**Fig 10.** Antivirais contra Influenza (ACS Infect. Dis. 2017, 3, 691–694).



**Fig 11.** Amantadina e aminoácidos alvo em M2 indicados.

As drogas mais recentes em uso 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 neuramínico e se libertar do muco (**Fig. 10**). As moléculas, suas estruturas tridimensionais e ligação ao sítio ativo da neuraminidase estão mostradas à **Fig 12**.



**Fig 12.** Das et al, 2010. Nature Structural Biology (doi:10.1038/nsmb.1779).

Pesquisas mostraram inicialmente que o vírus AH1N1, causador da pandemia de 2009, era 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 dessa pandemia isolados em laboratórios de pesquisa, ou seja, há variantes resistentes. Assim, fica a expectativa de que os novos antivirais, que visam diferentes alvos terapêuticos (**Fig. 10**), venham a ter eficácia comprovada nos testes clínicos em andamento.

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.