

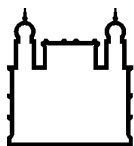
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS VIRUS INFLUENZA A,
CIRCULANTES NO BRASIL, AOS ANTIVIRAIS

THIAGO DAS CHAGAS SOUSA

Rio de Janeiro
Setembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Thiago das Chagas Sousa

**Avaliação da susceptibilidade dos vírus influenza A, circulantes no
Brasil, aos antivirais**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pela Pós-graduação em Medicina Tropical

Orientador (es): Prof. Dra. Aline da Rocha Matos
Prof. Dra. Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2021

Sousa, Thiago das Chagas.

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS VIRUS INFLUENZA A, CIRCULANTES NO BRASIL, AOS ANTIVIRAIS / Thiago das Chagas Sousa. - Rio de Janeiro, 2021.
118 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

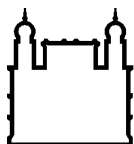
Orientadora: Aline da Rocha Matos.

Co-orientadora: Marilda Siqueira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. influenza A. 2. antivirias. 3. inibidores de neuraminidase. 4. adamantanos. 5. baloxavir marboxil. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/SciCT/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima • CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: THIAGO DAS CHAGAS SOUSA

**Avaliação da susceptibilidade dos vírus influenza A, circulantes no Brasil, aos
antivirais**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr^a. Aline da Rocha Matos
Prof. Dr^a. Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira**

Aprovado em: 20/09/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Patrícia Carvalho de Sequeira – Presidente (IOC)

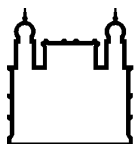
Prof. Dr^a. Livia Melo Villar (IOC)

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro (UFRJ)

Prof. Dr^a. Fernanda de Bruycker Nogueira (IOC)

Prof. Dr^a. Viveca Antonia Giongo Galvão da Silva (UNESA)

Rio de Janeiro, 20 de setembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de Thiago das Chagas Sousa, sob orientação da Dra. Aline da Rocha Matos e Co-orientação da Dra. Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira. Ao vigésimo dia do mês de setembro de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "Avaliação da susceptibilidade dos vírus influenza A, circulantes no Brasil, aos antivirais", no Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Patricia Carvalho de Sequeira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. José Nelson dos Santos Silva Cauceiro – UFRJ/RJ, Dr^a. Livia Melo Villar – IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Fernanda de Bruycker Nogueira – IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Viveca Antonia Giongo Galvão da Silva – UNESARJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador Adjunto do Programa Dr. Marco Aurélio Pereira Horta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de setembro de 2021.

Dra. Patricia Carvalho de Sequeira (Presidente da Banca):

Patricia C. Sequeira
Patricia C. Sequeira, PhD
Pesquisadora em Saúde Pública
Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ
Matricula 1891974

Dr. Marco Aurélio Pereira Horta (Coordenador do Programa):

Marco Aurélio Pereira Horta
Marco Aurélio Pereira Horta
Epidemiologista em Saúde Pública
de Vírus Respiratórios e Sarampo
Matr. 2006319 SIAPP - ITA 10000000

Dedico esse trabalho a meu amigo de pós Gabriel Barbosa (*In Memoriam*), que infelizmente nos deixou precocemente e a todas as vítimas da pandemia de COVID-19 no Brasil e no mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Neto e Silvia, e minha irmã, Juliana, por todo apoio, amor e alicerce essencial para a vida.

Agradeço a minha namorada, Ana Claudia, por todo apoio, amor e companheirismo fundamental para minha vida. Amo você!

Agradeço as minhas orientadoras Dra Aline Matos e Dra Marilda Siqueira, por todos os ensinamentos, conselhos, dedicação, paciência e ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho em uma instituição tão importante como a FIOCRUZ e me permitir iniciar meu sonho de ser um cientista.

Agradeço a meus irmãos científicos, Artur e Jéssica, por todo companheirismo, amizade e conselhos.

Agradeço a coordenação da Pós-Graduação em Medicina Tropical, Dra Marta Mutis e Dra Vanessa de Paula, por sempre serem solícitas e fazerem um trabalho tão exemplar.

Agradeço aos componentes da banca Dra Lívia Melo Villar, Dra Patrícia Sequeira, Dr José Nelson Couceiro, Dra Fernanda Nogueira e Dra Viveca Giongo por terem sido tão cordeais e solícitos ao aceitarem avaliar esse trabalho.

Agradeço a todos os docentes que se propuseram me ensinar, que dividiram o seu conhecimento comigo, a me estimularem a querer ser um docente também.

Agradeço a meus amigos da turma da Med Trop, “os farelos e açucares”, por todas as risadas e aprendizado juntos. Com certeza, o caminho foi mais leve por causa de vocês.

Agradeço aos meus amigos próximos, Alex Albuquerque, Michele Gabriele Pacheco, Thayssa Keren, Deborah Waillante, Maria Eduarda Monteiro, Tatiana Neves e Suelen Soares.

Agradeço a toda a equipe do LVRS, todos que conviveram comigo, que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão desse trabalho

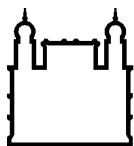
Agradeço a rede de vigilância brasileira de influenza, por começar esse nosso trabalho, e de realizar algo tão relevante para a nossa sociedade.

Agradeço a CAPES e a todas as agências de fomento, pela bolsa auxílio que permitiu a dedicação necessária para realização deste trabalho.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

E, por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me deram forças para chegar até aqui. Este trabalho não é meu, e sim nosso!

“Don’t Stop Believin’”. (Journey)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação da susceptibilidade dos vírus influenza A, circulantes no Brasil, aos antivirais

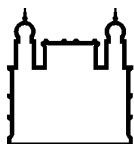
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Thiago das Chagas Sousa

Infecções pelo vírus influenza A (FluAV) têm grande importância para a saúde pública mundial, principalmente pelos subtipos A(H1N1)pdm09 e o A(H3N2), que causam epidemias anuais e pandemias esporádicas. Além da vacinação, o uso de fármacos antivirais é essencial para o controle destes patógenos. Atualmente, a classe dos inibidores de neuraminidase (NAIs) é a mais utilizada, sendo o fármaco oseltamivir (OST) o mais relevante. Mais recentemente, o fármaco baloxavir marboxil (BXM), da classe de inibidores de polimerase, foi licenciado em alguns países. Porém, devido à constante evolução dos genomas dos FluAVs, mutações nos genes que codificam as proteínas alvos dos antivirais podem levar à resistência ao tratamento. Este fenômeno foi previamente observado para a classe dos fármacos adamantanos, com disseminação de cepas com o marcador S31N no gene M2. Sendo assim, a vigilância de cepas carreando mutações associadas à redução da susceptibilidade (RS) aos NAIs deve ser realizada regularmente. Com relação ao BXM, também já foram relatadas mutações associadas à RS no gene da polimerase ácida (PA). Desta forma, esse estudo tem o objetivo de avaliar os FluAVs circulantes no Brasil, no período de 2017 a 2020, com relação a sua susceptibilidade aos principais antivirais, através de metodologias de sequenciamento genético e análises funcionais dos isolados virais com o OST. Para tal, foram analisadas 1020 amostras positivas para FluAV, oriundas de 9 estados do Brasil. Destas, 699 foram positivas para A(H1N1)pdm09 e 321 para A(H3N2). Analisamos 65,9% das amostras de A(H1N1)pdm09 através de triagem do alvo mais frequente (H275Y na NA), por pirosequenciamento, detectando-se uma amostra com esta substituição. Em seguida, através do sequenciamento completo dos genes alvo dos fármacos (NA, PA e M2), geramos 390 sequências do gene NA, 209 do gene M2 e 182 do gene PA. Assim, detectaram-se as seguintes substituições associadas à RS ao antivirais no gene NA: I222V (n=6), V149A (n=3), N329K (n=1), Q136K (n=1), Y155H (n=1) e Y155H/V149A (n=4). No gene M2, detectamos a alteração S31N (n=208) e, no gene PA, observamos a substituição E199D (n=1). Adicionalmente, foram obtidas sequências genéticas de FluAVs no banco de sequências GISAID, oriundas de 14 estados do Brasil. Destas, 323 sequências eram do gene NA, 248 do gene M2 e 245 do gene PA. Nestas, foram detectados os seguintes marcadores: Y155H (n=3), S247N (n=1), V149A (n=1) e V149A (n=15), na NA. Todas as sequências de M2 apresentavam o marcador S31N. Paralelamente, foram realizadas análises funcionais de susceptibilidade ao OST, em 314 isolados virais, sendo 231 A(H1N1)pdm09 e 83 de A(H3N2). Observou-se que todos os isolados apresentavam perfil normal de susceptibilidade ao OST. Desta forma, conclui-se que a frequência de cepas de FluAV estudadas, carreando mutações associadas à RS aos NAIs e BXM ainda é baixa (<1%) nas amostras circulantes no Brasil e que tais vírus, em sua maioria, continuam apresentando o marcador de resistência aos adamantanos. Esses dados podem auxiliar condutas clínicas e políticas públicas de compra, estocagem e licenciamento de fármacos contra influenza no Brasil.

Palavras-chaves: influenza A; resistência; antivirais; Oseltamivir; Baloxavir; adamantanos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Susceptibility assessment of influenza A viruses, circulating in Brazil, to antivirals

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Thiago das Chagas Sousa

Influenza A virus (FluAV) infections are of great importance to public health worldwide, mainly due to the A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) subtypes, which cause annual epidemics and sporadic pandemics. Besides vaccination, the use of antiviral drugs is essential for the control of these pathogens. Currently, the class of neuraminidase inhibitors (NAIs) is the most used, with the drug oseltamivir (OST) being the most relevant. More recently, the drug baloxavir marboxil (BXM), from the polymerase inhibitor class, has been licensed in some countries. However, due to the constant evolution of the FluAV genomes, mutations in the genes that encode antiviral target proteins can lead to resistance to the treatment. This phenomenon had previously been observed for the adamantanes drug class, with the emergence and dissemination of strains with the S31N marker in the M2 gene. Therefore, surveillance of strains carrying mutations associated with reduced susceptibility (RS) to NAIs must be carried out regularly. Regarding BXM, mutations associated with RS in the acid polymerase (PA) gene have also been reported. Therefore, this study aims to evaluate the FluAVs circulating in Brazil, from 2017 to 2020, regarding their susceptibility to the main antivirals, through genetic sequencing methodologies and functional analysis of viral isolates with OST. To this end, 1020 FluAV positive samples, from 9 states in Brazil, were analyzed. From them, 699 were A(H1N1)pdm09 and 321 A(H3N2). Of these, 65.9% of the A(H1N1)pdm09 samples were submitted to screening for the target most frequently associated with RS (H275Y in NA), by pyrosequencing, which detected a sample with this substitution. Then, the complete sequencing of the drugs' target genes was performed, generating 390 sequences of the NA gene, 209 of the M2 gene, and 182 of the PA gene. Thus, the following substitutions associated with RS to antivirals were detected in NA: I222V (n=6), V149A (n=3), N329K (n=1), Q136K (n=1), Y155H (n=1) and Y155H /V149A (n=4). In the M2 gene, we detected the substitution S31N (n=208) and, in PA gene, the following E199D (n=1). Additionally, we analyzed FluAV genetic sequences downloaded from the GISAID sequence bank from 14 Brazilian states. Whose, 321 sequences were from the NA gene, 248 from the M2 gene, and 245 from the PA gene. In these, the following markers were detected: Y155H (n=3), S247N (n=1), V149A (n=1) and V149A (n=15), in the NA. All M2 sequences had the S31N substitution. In parallel, functional analysis of susceptibility to OST were carried out in 314 viral isolates, 231 A(H1N1)pdm09 and 83 A(H3N2). It was observed that all isolates had a normal profile of susceptibility to OST. Thus, it is concluded that the frequency of studied FluAV strains, in circulating samples in Brazil, carrying mutations associated with RS to NAIs and BXM is still low (<1%) and that such viruses, for the most part, continue to present the marker of resistance to adamantanes. These data can help clinical conduct and public policies for the purchase, storage, and licensing of drugs against influenza in Brazil.

KEY-WORDS: influenza A; resistance; antivirals; Oseltamivir; Baloxavir; adamantanes.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Os vírus influenza.....	1
1.1.1 Histórico.....	1
1.1.2 Epidemiologia dos vírus influenza	6
1.1.3 Rede de vigilância	8
1.1.4 Taxonomia, morfologia e genética	9
1.1.5 Ciclo Replicativo	15
1.1.6 Evolução viral	17
1.1.7 Resposta imune do hospedeiro contra infecções por FluAV	19
1.1.8 Prevenção e Controle	21
1.1.9 Inibidores do canal iônico - adamantanos.....	23
1.1.10 Resistência aos inibidores do canal iônico.	25
1.1.11 Inibidores de Neuraminidase (NAIs).	26
1.1.12 Resistência aos NAIs.....	29
1.1.13 Inibidores de Endonuclease dependente de cap.	34
1.1.14 Resistência aos Inibidores de endonuclease dependente de cap.	36
1.2 Justificativa.....	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Amostragem.....	40
3.2 Comitê de ética.....	41
3.3 Coleta e processamento de amostras clínicas	41
3.4 Detecção e subtipagem molecular de FluAV nas amostras do estudo.....	41
3.5 Sequenciamento genético viral.....	42

3.5.1	Pirossequenciamento	42
3.5.2	Sequenciamento de Sanger	43
3.5.3	Sequenciamento de nova geração (NGS)	45
3.6	Análise de sequências depositadas em bancos de dados públicos.....	45
3.7	Cultura de células e isolamento viral	46
3.8	Ensaio funcional de sensibilidade dos isolados de FluAV ao NAI OST.....	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Caracterização da população de estudo.	48
4.2	Detecção de marcadores genéticos associados com RS ao antivirais.....	49
4.3	Análise da sensibilidade dos FluAV circulantes no Brasil, ao fármaco NAI OST.....	55
5	DISCUSSÃO	59
6	PERSPECTIVAS	66
7	CONCLUSÕES	67
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9	ANEXOS	92
	Anexo 01.....	92

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Linha do tempo com os principais acontecimentos em relação ao FluV nos séculos XX e XXI.	4
Figura 1.2 - Diagrama representativo do rearranjo que originou a linhagem de influenza A(H1N1)pdm09.	5
Figura 1.3 - Hospedeiros dos vírus influenza.	6
Figura 1.4 - Esquema representativo do vírion de FluAV.	10
Figura 1.5 - Hemaglutinina do FluAV.	12
Figura 1.6 - Neuraminidase do FluAV.	13
Figura 1.7 - Canal iônico M2.	14
Figura 1.8 - Esquema do ciclo replicativo do vírus FluAV.	17
Figura 1.9 - Mecanismos de evolução do vírus influenza por <i>drift</i> e <i>shift</i> antigênicos.	19
Figura 1.10 - Estrutura dos fármacos adamantanos e seus derivados amantadina e rimantadina.	23
Figura 1.11 - Mecanismo de ação dos inibidores do canal iônico M2.	24
Figura 1.12 - Estrutura molecular dos fármacos NAIs.	27
Figura 1.13 - Atividade da NA e mecanismo de ação dos NAIs.	28
Figura 1.14 - Mecanismo de resistência ao OST mediada por mutações na NA.	31
Figura 1.15 - Estrutura molecular dos compostos Ácido baloxavir e Baloxavir marboxil.	34
Figura 1.16 - Mecanismo de ação dos inibidores de endonuclease dependentes de cap.	36
Figura 3.1 - Mapa político do Brasil mostrando os estados de origem das amostras de estudo.	41
Figura 4.1 - Pirograma para triagem da substituição H275Y na NA viral.	50
Figura 4.2 - Valores de IC ₅₀ do fármaco OST para isolados brasileiros do vírus A(H1N1)pdm09, do período do estudo.	57
Figura 4.3 - Valores de IC ₅₀ do fármaco OST para isolados brasileiros do vírus A(H3N2), dos anos de 2017, 2018, 2019 e total.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Segmentos gênicos de FluAV e proteínas codificadas.....	10
Tabela 1.2 - Lista de substituições na NA identificadas no Brasil entre 2009 e 2016.	33
Tabela 3.1 - Ciclagem da reação de RT-PCR pelo alvo NA H275Y	42
Tabela 3.2 - Ciclagem da reação de síntese de cDNA.....	43
Tabela 3.3 - Ciclagem da reação de PCR para amplificação do gene NA	44
Tabela 3.4 - Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento completo do gene NA, pela metodologia de Sanger.	44
Tabela 3.5 - Reação de purificação dos fragmentos de NA para sequenciamento	44
Tabela 3.6 - Reação de sequenciamento do gene da NA.....	45
Tabela 3.7 – Critérios para avaliação fenotípica dos FluAVs ao NAIs.....	47
Tabela 4.1- Perfil virológico, epidemiológico e clínico das amostras incluídas no estudo, por ano.	48
Tabela 4.2 - Triagem molecular, pelo alvo H275Y, de amostras de A(H1N1)pdm09, por ano.	49
Tabela 4.3 – Amostras de FluAVs com os genes NA, M2 e PA sequenciados, distribuídas de acordo com ano de coleta e subtipo.....	51
Tabela 4.4 - Dados clínico-epidemiológicos das amostras carreando substituições associadas com RS aos NAIs	52
Tabela 4.5 - Amostra de A(H3N2) sem marcadores de resistência aos fármacos adamantanos.	53
Tabela 4.6 - Amostra carreando marcador associado com RS aos inibidores de endonuclease dependente de cap.	53
Tabela 4.7 - Número de sequências genéticas de FluAV circulantes no Brasil, de regiões fora da abrangência do NIC Fiocruz, depositadas no GISAID, de acordo com os genes de interesse aos antivirais, por ano e subtipo.....	54
Tabela 4.8 - Sequências genéticas de outras regiões brasileiras, carreando marcadores associadas a RS aos NAIs.	54
Tabela 4.9 - Número de isolados de FluAV durante o período de estudo, de acordo com subtipo e ano de circulação.....	55
Tabela 4.10 - Número de isolados de A(H1N1)pdm09 e a mediana correspondente de cada ano incluídos no estudo.....	56

Tabela 4.11 - Número de isolados de A(H3N2) e a mediana correspondente de cada ano incluídos no estudo.....	58
--	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Alanina
ARS	Alta redução de susceptibilidade
AS	Ácido siálico
BXA	Ácido baloxavir
BXM	Baloxavir Marboxil
CCs	Centros Colaboradores
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
D	Ácido Aspártico
DNAc	DNA complementar
E	Ácido Glutâmico
EUA	Estados Unidos da América
F	Fenilalanina
FluAV	Vírus influenza A
FluBV	Vírus influenza B
FluCV	Vírus influenza C
FluDV	Vírus influenza D
FluV	Vírus influenza
G	Glicina
GISAID	<i>Global Initiative on Sharing Influenza Data</i>
GISRS	Sistema Global de Vigilância e Resposta à Influenza
H	Histidina
HA	Hemaglutinina
I	Isoleucina
IAL	Instituto Adolfo Lutz/SP
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% a atividade de uma enzima
IEC	Instituto Evandro Chagas/PA
IFNs	Inferferons
IFTMs	Proteínas transmembranares induzidas por interferons
ILs	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISGs	Genes estimulados por interferon
K	Lisina
L	Leucina

LACENs	Laboratórios Estaduais Centrais de Saúde Pública
LAN	Laninamivir
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
M	Metionina
MP	Proteína de matriz
MS	Ministério da Saúde
MXa	Proteína resistente a myxovirus
N	Asparagina
NAIs	Inibidores de neuraminidase
NEP	Proteína de exportação nuclear
NICs	Centros nacionais de influenza
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Receptores tipo NOD
NOD	Domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo
NP	Proteína nuclear
NS	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
OST	Oseltamivir
PA	Polimerase ácida
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PER	Peramavir
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
Q	Glutamina
RdRP	Polimerase dependente de RNA
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RIG-I	Gene Induzido por ácido Retinóico
RLT	Receptores tipo <i>Toll</i>
RNAc	RNA complementar
RNAm	RNA mensageiro
RNAv	Ácido ribonucleico viral
RNPc	RNP complementar
RNPv	Ribonucleoproteínas virais

RS	Redução de susceptibilidade
S	Serina
SN	Susceptibilidade normal
SG	Síndrome gripal
SNC	Sistema nervoso central
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
T	Treonina
TFN	Fator de necrose tumoral
TRIM	<i>Tripartite Motif</i>
UTRs	Regiões não traduzidas
V	Valina
W	Triptofano
WHO	World Health Organization (WHO - Organização Mundial de Saúde)
WT	<i>Wild Type</i>
Y	Histidina
ZAN	Zanamivir

1 INTRODUÇÃO

O vírus influenza (FluV) é um dos patógenos mais bem-sucedidos e imprevisíveis que acometem a saúde humana e animal, causando epidemias anuais e com potencial para pandemias por novos subtipos¹. A infecção por FluV causa uma doença aguda e febril, conhecida popularmente como gripe, normalmente autolimitada em pessoas híidas². Porém, em grupos vulneráveis, como imunodeprimidos, crianças menores de cinco anos de idade, idosos acima de 60 anos e indivíduos com comorbidades, como obesidade, cardiopatia e transplante de órgãos, aumenta-se o risco de agravamento da doença, com necessidade de internações hospitalares e evolução para óbito³.

O FluV é transmitido por meio de gotículas de secreções respiratórias lançadas no ambiente pelo aerossol, de forma sustentada entre humanos (pessoa-pessoa), ou de forma indireta, através de contato com objetos contaminados, podendo também ser transmitido por animais infectados⁴. Esse agente patogênico possui relevância para a saúde pública mundial, causando um grande impacto econômico, com alto custo das internações hospitalares e redução da mão de obra produtiva⁵, além de alta carga de mortalidade e morbidade, principalmente nos meses de outono e inverno^{6,7}. As estimativas atuais anuais são de um bilhão de casos de síndrome gripal (SG), que é sua manifestação branda. Destes, de três a cinco milhões de casos evoluem para sua forma severa, a síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e 290-650.000 de casos concluem-se em óbitos no mundo todo⁸.

1.1 Os vírus influenza

1.1.1 Histórico

A muitos séculos já se especula que o FluV afete a humanidade. Um dos apontamentos mais antigos seria de Hipócrates, no século V a.C., nos arredores da atual Turquia, onde foi descrito um agravo com sintomas e sazonalidade semelhantes aos causados pela infecção por FluV^{9,10}. No século XV, surgiu o nome “influenza”, com origem relacionada a uma epidemia na Itália, onde acreditavam ser causada por *influentia* das estrelas¹¹. Já a primeira pandemia causada por FluV unanimemente reconhecida ocorreu em 1580, iniciando-se na Ásia, seguindo para Europa e Américas¹². A partir do século XVIII, os relatos sobre possíveis surtos de influenza

aumentaram em qualidade e em quantidade de dados¹³, tendo registros de pandemias em 1729, iniciando na Rússia; em 1781 e 1830, começando na China, e, em 1889, com emergência novamente na Rússia¹⁴.

No século XX e início do século XXI, ocorreram alguns dos eventos mais relevantes da história do FluV (figura 1.1). Em 1918, iniciou-se a maior pandemia desse século, conhecida como “Gripe Espanhola”, que ocorreu em três ondas epidêmicas, entre os anos de 1918 e 1919, com estimada de infecção de um terço da população global e cerca de 50 milhões de óbitos¹⁵. A primeira onda aconteceu durante o mês de março (primavera do hemisfério norte) de 1918, com surtos simultâneos em regiões diferentes dos Estados Unidos da América (EUA)¹⁶. Em seguida, o vírus chegou à Europa junto das tropas norte americanas da Primeira Guerra mundial, o que influenciou o curso da guerra, alcançando outros continentes, como África, Ásia e Oceania¹². Esta onda teve duração média de 6 meses¹². Na segunda onda, que ocorreu no outono, entre agosto/setembro de 1918, foi observada uma apresentação mais transmissível e mortal, em comparação com a primeira onda, sendo a maior parte dos óbitos da pandemia relacionados com esse período. Muitos países também apresentaram uma terceira onda, no início de 1919 (inverno do hemisfério norte), com magnitude similar à da segunda onda, havendo uma parte substancial dos óbitos ocorrendo devido a infecções secundárias com patógenos adicionais após infecção primária por FluV¹⁷. O agente etiológico desta pandemia influenza A(H1N1), só foi identificado em 1997, quando foram recuperados fragmentos de RNA viral, presentes em amostras preservadas de pulmão de soldados mortos na pandemia¹⁸. Como a maioria dos óbitos aconteceu em indivíduos na faixa etária entre 20 e 40 anos, levantou-se a hipótese de que a população mais idosa da época poderia já ter adquirido imunidade por exposição à vírus de surtos anteriores¹⁹.

Uma década depois, em 1928, descobriu-se que a doença era causada por um agente infeccioso, ao utilizar-se experimentos com suínos²⁰. Em 1933, foi visto que se tratava de um agente filtrável, capaz de ser transmitido entre animais diferentes e de gerar resposta imunológica pelo organismo hospedeiro. Desde então o patógeno foi chamado de vírus influenza A (FluAV)²¹.

Em 1940, após uma epidemia de doença respiratória aguda em *Irvington House*, EUA, com sintomatologia semelhante, mas resposta antigênica diferente do FluAV, identificou-se o então nomeado vírus influenza B (FluBV)²². Já uma década depois, em 1951, foi identificado o terceiro FluV conhecido, o vírus influenza C (FluCV)²³.

Em 1957, ocorreu a segunda pandemia de influenza no século XX. Apresentando surtos iniciais na China e Hong Kong, a infecção levou em torno de 6 meses para se espalhar por todo o mundo¹². Tornando-se popularmente conhecida como “Gripe Asiática”, o agente etiológico dessa pandemia foi o A(H2N2), que havia substituído o A(H1N1) causador da pandemia de 1918²⁴.

Em 1966, ocorreu o licenciamento do fármaco amantadina, da classe antiviral dos inibidores do canal iônico M2, o primeiro fármaco com atividade anti-influenza a ser liberado para uso²⁵.

O evento pandêmico seguinte ocorreu em 1968, quando o novo subtipo de FluAV, o A(H3N2), emergiu substituindo o até então circulante A(H2N2). Seu surgimento ocorreu através de um rearranjo antigênico, processo que também havia acontecido com o A(H2N2)²⁴. Com início no sudeste asiático, essa pandemia ficou conhecida como “gripe de Hong Kong”, porém sua taxa de mortalidade foi baixa, comparada com as pandemias anteriores. A imunidade prévia ao antígeno neuraminidase (NA), que não foi modificado pelo rearranjo antigênico²⁶, foi o provável motivo para a menor mortalidade.

Em 1976, em uma plataforma militar nos EUA, ocorreu um surto de infecção respiratória com 230 infectados e um óbito, causado por uma cepa de A(H1N1) de origem suína. Um ano depois, outro surto foi registrado, na Sibéria, cujo evento ficou conhecido como “Gripe Russa”, e apresentava como agente etiológico novamente o vírus A(H1N1), semelhante ao que circulava décadas atrás. Este vírus causou um agravo brando e afetou principalmente indivíduos com menos de 25 anos. Em seguida, o patógeno se espalhou pelo mundo, sendo este surto visto como uma “pseudo pandemia”. Desde então, o subtipo A(H1N1) continua em circulação²⁷.

Em 1999, houve o licenciamento de uma segunda geração de fármacos contra influenza, os inibidores de neuraminidase (NAIs).

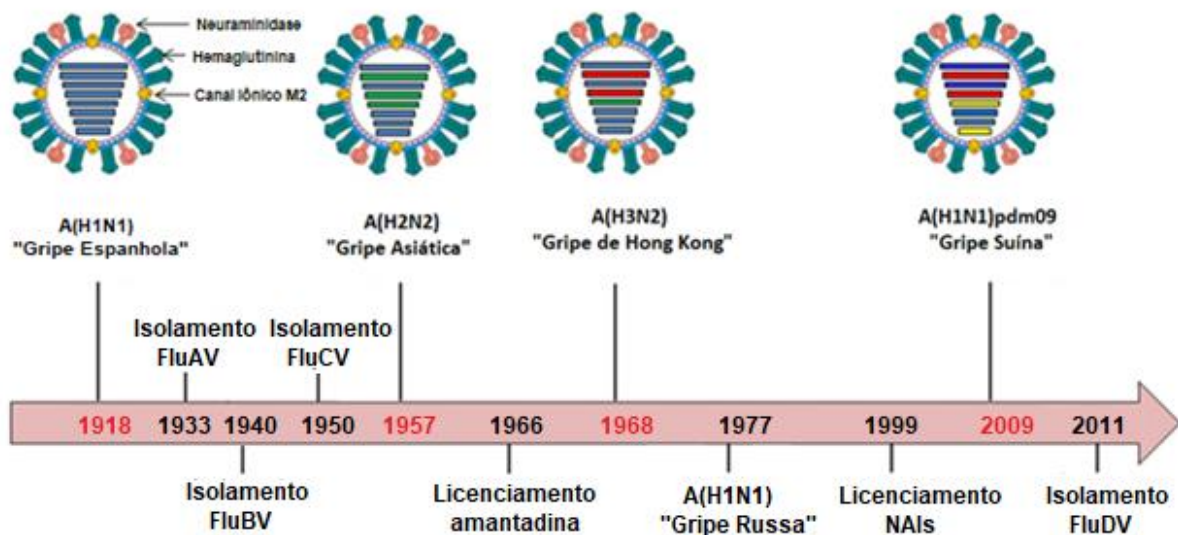


Figura 1.1 - Linha do tempo com os principais acontecimentos em relação ao FluV nos séculos XX e XXI.

A figura mostra os principais eventos envolvendo o vírus influenza no século XX e início do século XXI, apresentando o ano e como o evento ficou conhecido. Acima de cada evento pandêmico é apresentado um esquema da cepa de FluAV que causou cada pandemia. As barras coloridas de cada cepa de FluAV são os segmentos gênicos viral. Barras da mesma cor demonstram os segmentos que vieram da mesma origem. Os esquemas virais, com segmentos de cores diferentes estão representando os segmentos obtidos através do processo de rearranjo. Adaptado de Kumar *et al.* 2018²⁵.

No final da década de 2000, na América do norte, ocorreu a emergência de uma nova linhagem do vírus A(H1N1), que substituiu a linhagem sazonal até então circulante. Este novo vírus, denominado A(H1N1)pdm09, foi resultado de um grande processo de rearranjo gênico, o qual apresentava os genes da polimerase ácida (PA) e polimerase básica 2 (PB2) oriundos do vírus de linhagem aviária norte americana, o segmento polimerase básica 1 (PB1) do vírus A(H3N2) sazonal, a hemagglutina (HA), proteína nuclear (NP) e proteína não estrutural (NS) da linhagem suína norte-americana e os genes da NA e proteína de matriz (MP) vindos de suínos da Europa e Ásia²⁸⁻³⁰ (figura 1.2). Os primeiros casos de infecção por A(H1N1)pdm09 foram relatados no México e nos EUA em abril de 2009³¹. Em poucas semanas, o vírus espalhou-se pelo mundo, sendo declarada sua pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO)³² em junho de 2009, popularmente conhecida como “Gripe Suína”. As infecções causadas pelo novo vírus pandêmico apresentaram alta transmissibilidade, porém mortalidade moderada, de forma semelhante à causada pelo até então circulante A(H1N1) sazonal e afligiu principalmente os indivíduos com menos de 65 anos. Este fato gerou a especulação que a população mais idosa já possuía alguma imunidade prévia, provavelmente decorrentes de exposições a outras

linhagens virais semelhantes³³. Em agosto de 2010, a WHO declarou o fim do pandemia de 2009, com estimativa de até 200 milhões de casos da doença e aproximadamente 18500 óbitos, porém esse número que pode ser até 15 vezes maior³⁴. Desde então, o vírus A(H1N1)pdm09 cocircula com o A(H3N2) e ao FluBV, causando surtos e epidemias regularmente.

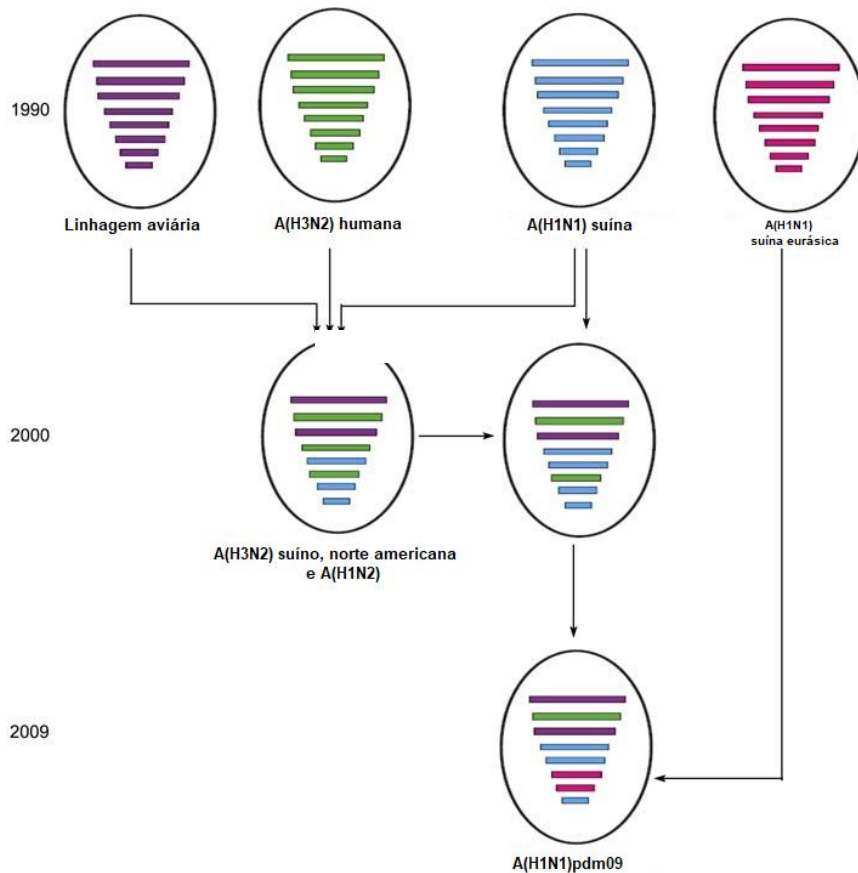


Figura 1.2 - Diagrama representativo do rearranjo que originou a linhagem de influenza A(H1N1)pdm09.

O processo que deu origem a cepa A(H1N1)pdm09 ocorreu através de três rearranjos distintos. O primeiro evento aconteceu durante a década de 1990, em que três cepas de FluV distintas (uma de origem aviária, uma de H3N2 humana e uma H1N1 suína) originaram uma cepa de A(H3N2) que circulava em suínos. Em seguida, essa nova cepa passou por um rearranjo com uma cepa de A(H1N1), dando origem a cepa de A(H1N2). Em 2009, o derradeiro rearranjo aconteceu, entre a cepa de A(H1N2) e outra cepa de A(H1N1) suína, que circulava na eurásia, o que deu origem a cepa pandemia A(H1N1)pdm09. Nas figuras demonstrando os vírus, as barras coloridas representam os segmentos gênicos virais, podendo acompanhar a origem de cada segmento à cada processo de rearranjo. Adaptado de Gao & Sun, 2010³⁵.

Mais recentemente, em 2011, foi isolada, em suínos, a cepa “C/swine/Oklahoma/1334/2011”, que apresentava 50% de homologia com o FluCV. Uma vez que os anticorpos produzidos em resposta a essa infecção não

neutralizavam nenhum FluV até então descrito, além do novo isolado apresentar características fenotípicas diferentes do FluCV, foi proposta a reclassificação e criação do gênero vírus influenza D (FluDV)³⁶, em 2016.

1.1.2 Epidemiologia dos vírus influenza

Os FluVs são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros. Os FluAVs são os que possuem mais hospedeiros conhecidos, podendo infectar ao homem, aves silvestres e domésticas, mamíferos terrestres e marinhos e até morcegos^{37,38}. Seu reservatório natural são as aves silvestres marinhas. O FluBV tem o homem como principal hospedeiro, mas também já foi detectado em focas³⁹. O FluCV possui o homem e suínos como hospedeiros, enquanto o FluDV possui os suínos, bovinos e caprinos como hospedeiros⁴⁰ (Figura 1.3).

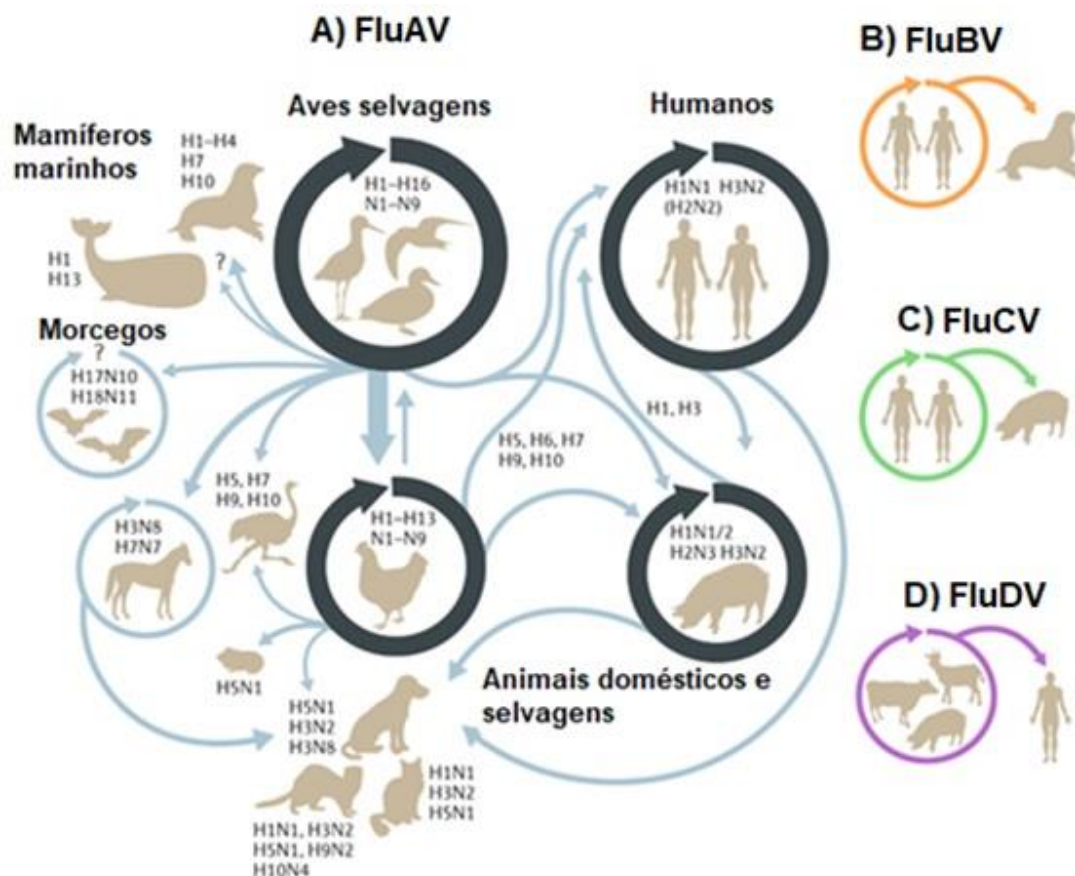


Figura 1.3 - Hospedeiros dos vírus influenza.

Esquema exemplificando a diversidade de hospedeiros que os FluVs infectam. A) FluAV apresenta variados subtipos, determinados pela combinação das glicoproteínas HA e NA, dependendo de seu reservatório animal, como as aves selvagens, e capaz de infectar uma grande diversidade de hospedeiros. B) Os FluBVs infectam ao homem e focas. C) Os FluCVs infectam ao homem e suínos. D) Os FluDVs infectam bovinos, suínos e caprinos. Adaptado de Long *et al.*, 2019⁴⁰.

Em relação ao homem, estima-se que entre 10% à 20% da população mundial seja afetada por estes vírus, alcançando cerca de 1 bilhão de casos, com de 3 a 5 milhões de hospitalizações e 500 a 650 mil óbitos, por ano⁸. Até o momento, os subtipos de FluAV conhecidos por infectar frequentemente ao homem são o A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2). Além disso, ocasionalmente ocorrem infecções e surtos esporádicos com as linhagens aviárias A(H5N1), A(H7N9) e A(H9N2). Adicionalmente, já foram relatados casos pontuais em humanos com os subtipos A(H1N2) suíno⁴¹ e A(H10N3) aviário⁴², dentre outros⁴³. Já o FluBV atualmente possui duas linhagens conhecidas, *Yamagata* e *Victória*, também apresenta perfil sazonal, com prevalência alternada ou cocirculação, a depender do ano.

Apesar da alta transmissibilidade, a doença causada pelo FluV é normalmente branda e auto limitada. Porém, alguns grupos de indivíduos, como crianças (menores que 5 anos), idosos (maiores que 60 anos), gestantes, puérperas, imunocomprometidos, portadores de doenças crônicas, fumantes e obesos⁴⁴ estão mais propensos a desenvolver a forma grave da doença, que pode evoluir a óbito⁴⁵. Para estes, é recomendada a vacinação anual e o tratamento de fármacos antivirais específicos para conter a infecção ou como profilaxia. Entretanto, alguns grupos de risco, como os imunocomprometidos, quando não respondem de forma eficiente ao tratamento, podem apresentar excreção viral (do inglês *shedding*) prolongada (maior do que 1 semana)⁴⁶, o que pode levar à emergência de variantes resistentes ao tratamento⁴⁷.

Em relação à sazonalidade, os FluVs apresentam um perfil complexo, com influência de um conjunto de fatores populacionais (imunidade de rebanho, interações sociais, comportamentais e culturais), virais (contínuo processo de evolução, com geração e seleção de novas linhagens) e ecológicos/ambientais⁴⁸. Os períodos de maior incidência desses vírus são durante as estações mais frias do ano, outono e inverno de cada hemisfério, quando as condições ambientais de baixa umidade e temperatura são sugeridas para prolongar a excreção viral e a transmissão do vírus⁶. No hemisfério norte, com maior presença de regiões com o clima temperado e estações bem definidas, a sazonalidade das epidemias de influenza é marcada por alternância na temperatura, umidade, entre outros. Já no hemisfério sul, com maior predominância de regiões tropicais e subtropicais, os períodos de maior circulação são mais diversificados, com estações não tão bem definidas⁴⁹. No Brasil, por possuir dimensões continentais, a sazonalidade de cada região é heterogênea, fator importante para definir estratégias de contenção do vírus, como vacinação.

1.1.3 Rede de vigilância

Com o intuito de diminuir o impacto causado pelos FluVs, em 1952, a WHO estabeleceu o Sistema Global de Vigilância e Resposta à Influenza (GISRS)⁵⁰, com os objetivos de agir como um mecanismo global de vigilância, preparação e resposta para influenza sazonal, pandêmica e zoonótica; como plataforma global para monitorar a epidemiologia e doença; e realizar um alerta global para surgimento de novos FluVs e outros patógenos respiratórios.

A rede GISRS consiste em centros nacionais de influenza (NICs), que conduzem a vigilância do FluV, fazem caracterizações moleculares e antigênicas e estudam as tendências do agravo influenza. Além dos NICs, existem os Centros Colaboradores (CCs) da WHO que conduzem pesquisas e análises adicionais sobre as informações e amostras coletadas pelo NICs. Atualmente, existem 142 NICs em 112 países ao redor do mundo e 07 CCs (localizados na Austrália, China, 02 nos EUA, Inglaterra, Japão e Rússia)⁵¹. Duas vezes por ano, a WHO convoca consultas técnicas para fazer as recomendações sobre os vírus a serem incluídos nas vacinas contra FluV para as temporadas seguintes nos hemisférios norte e sul, respectivamente.

No Brasil, a rede de vigilância de influenza possui os seguintes objetivos: monitorar as cepas circulantes, avaliar o impacto da vacinação, acompanhar a tendência da morbidade e mortalidade, identificar grupos e fatores de risco, detectar e oferecer resposta rápida à circulação de novos subtipos virais que poderiam estar relacionados casos esporádicos ou potencial pandêmico, produzir e disseminar informações epidemiológicas e avaliar a circulação de vírus resistentes aos antivirais². A rede brasileira é formada por 3 NICs, que são o Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS) Fiocruz/RJ, Instituto Adolfo Lutz/SP (IAL) e Instituto Evandro Chagas/PA (IEC). Há 27 Laboratórios Estaduais Centrais de Saúde Pública (LACENs) e 252 unidades sentinelas. As unidades sentinelas realizam as coletas das amostras de secreções respiratórias, oriundas de pacientes com suspeita para infecção por FluV e encaminham-nas para os LACENs, que realizam o processamento inicial das amostras coletadas e diagnóstico laboratorial viral. Em seguida, amostras representativas de cada região são enviadas aos NICs, onde pode ser realizada a confirmação do diagnóstico, além de caracterização molecular e antigênica para acompanhamento da evolução das cepas circulantes.

1.1.4 Taxonomia, morfologia e genética

Estes vírus pertencem à família *Orthomyxoviridae*, que possui 4 gêneros: *Alphainfluenza*, *Betainfluenza*, *Gammainfluenza* e *Deltainfluenza*; onde cada gênero possui uma espécie: A, B, C e D, respectivamente⁵². O FluAV também é classificado em subtipos, de acordo com as propriedades antigênicas de suas glicoproteínas de superfície: HA e NA. Até o momento, são conhecidos 18 subtipos de HA (1-18) e 11 subtipos de NA (1-11)^{37,38}. Destes, os tipos H1, H2, H3, N1 e N2 são os que comumente afetam ao homem. Eventualmente, os tipos H5, H7 e H9, de origem aviária, também são capazes de infectar ao homem⁵³. Já o FluBV é classificado em duas linhagens, Yamagata e Victoria, enquanto os FluCV e FluDV ainda não possuem outras subclassificações.

Morfologicamente, os FluV são pleomórficos, apresentando formato esférico ou filamentosos com tamanho médio de 100 nm⁵⁴, possuindo envelope lipídico, contendo as glicoproteínas virais HA e NA⁵⁴ na proporção de 4 moléculas de HA por 1 de NA⁵⁵. No envelope, também se encontram as proteínas de canal iônico M2, em FluAV, ou BM2 e NB, nos FluBV⁵⁴. Abaixo do envelope viral, encontram-se o capsídeo viral, composto pela proteína M1, e a proteína de exportação nuclear (NEP)⁵⁴. No interior do capsídeo viral, está localizado o material genético do vírus (Figura 1.4 A).

O genoma destes vírus é segmentado e composto de RNA viral (RNAv), de fita simples, com polaridade negativa, apresentando, em média, 13,5 kilobases⁵⁶. O RNAv é encontrado em estruturas chamadas de ribonucleoproteínas virais (RNPVs)⁵⁷, que são formadas de diversas cópias da nucleoproteína (NP), que envolvem os segmentos gênicos e são associadas com o complexo da polimerase viral⁵⁸ (Figura 1.4 B). Sua polimerase é dependente de RNA (RdRp) e é formada por um complexo com 3 subunidades (PA, PB1 e PB2). Cada RNPv funciona como uma unidade independente para a replicação e transcrição⁵⁹ (Figura 1.4 C) que dará origem às proteínas virais. Até o momento, são conhecidas 10 proteínas estruturais e, ao menos, 9 proteínas acessórias⁶⁰⁻⁶². FluAV e FluBV possuem 8 RNPVs, enquanto os vírus FluCV e FluDV apresentam 7 dessas estruturas. Nos FluAV e FluBV, os segmentos 1, 4, 5 e 6 codificam apenas uma proteína, por segmento, sendo PB2, HA, NP e NA, respectivamente^{55,63}. Os segmentos 7 (FluAV) e 8 (FluAV e FluBV) codificam duas proteínas, por segmento, através do mecanismo de *splicing* alternativo do RNAm⁵⁴ (Figura 1.4 D e Tabela 1.1).

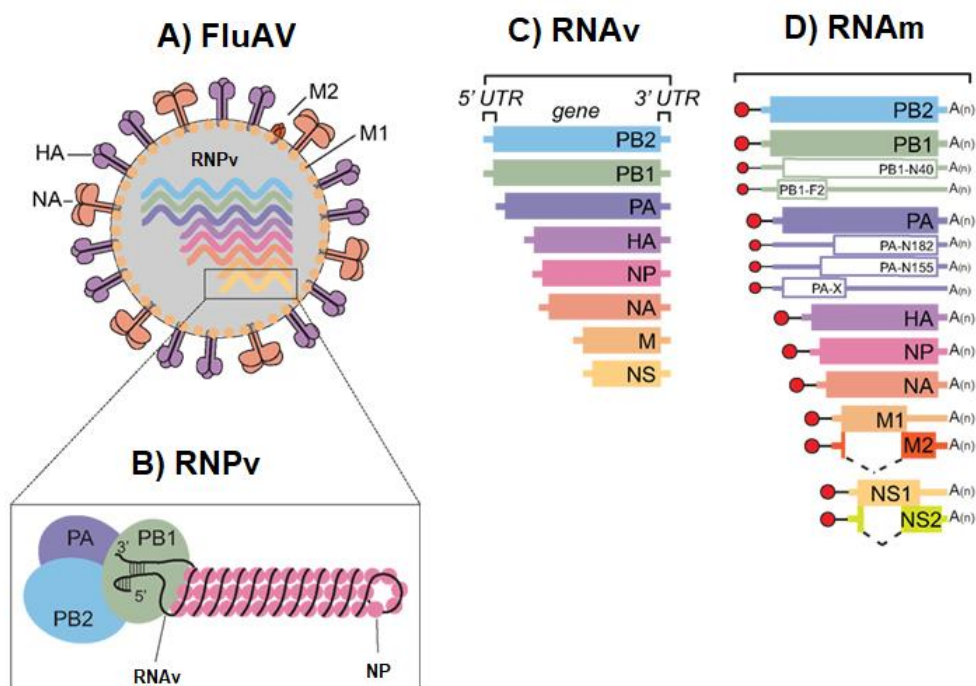


Figura 1.4 - Esquema representativo do vírion de FluAV.

A) Esquema da partícula viral, demonstrando as glicoproteínas de superfície HA e NA, o canal iônico M2, o capsídeo formado pela proteína M1 e, internamente, as ribonucleoproteínas virais (RNPVs). B) Estrutura das RNPVs, compostas por RNA viral (RNAv), envolto pelas nucleoproteínas e associado com o complexo polimerase. C) Organização do genoma de FluAV. O RNAv é flanqueado pelas regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs), que contêm os promotores virais. D) Diagrama dos RNAm virais transcritos a partir dos modelos de RNAv do FluAV. Os retângulos indicam o produto do gene viral codificado por cada RNAm e as linhas tracejadas mostram o *splicing* alternativo dos transcritos M e NS. Círculos vermelhos representam a estrutura cap 5' M7pppG e as linhas pretas denotam os 10–20 nucleotídeos iniciadores derivados do hospedeiro, que são obtidos pelo mecanismo de captura da polimerase viral, enquanto (n) corresponde a cauda 3' poli-A viral. Adaptado de Dou *et al.*, 2018⁶⁴.

Tabela 1.1 - Segmentos gênicos de FluAV e proteínas codificadas.

PB1 – Polimerase básica 1; PB2 – Polimerase básica 2; PA – Polimerase ácida; HA – Hemaglutinina; NP – Nucleoproteína; NA – Neuraminidase; MP – Proteína M; NS – Proteína Estrutural; NEP – Proteína de Exportação nuclear. Adaptado de Bouvier & Palese, 2008⁵⁵.

Segmento	Tamanho do segmento (nucleotídeos)	Proteína(s) codificada(s)	Tamanho da proteína (aminoácidos)	Função da proteína
1 (PB2)	2341	PB2	759	Subunidade da polimerase. Reconhecimento do domínio 5' cap do RNAm
2 (PB1)	2341	PB1	757	Subunidade da polimerase. Alongamento do RNA, atividade de endonuclease e atividade pró-apoptótica.
		PB1-F2	87	
3 (PA)	2233	PA	716	Subunidade da polimerase. Atividade de protease

4 (HA)	1778	HA	550	Glicoproteína de superfície. Maior antígeno. Função de ligação com o receptor e atividade de fusão.
5 (NP)	1565	NP	498	Proteína ligada ao RNAv. Regulação da importação nuclear
6 (NA)	1413	NA	454	Glicoproteína de superfície. Atividade de sialidase e liberação viral.
7 (MP)	1027	M1	252	Proteína da matriz. Interação com as RNPvs virais e glicoproteínas.
		M2	97	Proteína de membrana. Forma o canal iônico e responsável pela montagem viral.
8 (NS)	890	NS1	230	Proteína não-estrutural. Regulação da expressão gênica do hospedeiro, antagonista de interferon.
		NEP/NS2	121	Proteína não-estrutural de exportação nuclear dos RNPvs virais.

Os primeiros 3 e maiores segmentos gênicos dão origem às proteínas PB2, PB1 e PA, respectivamente, do complexo polimerase, que é funcional para a transcrição e replicação viral, participando da clivagem de RNAm iniciador do hospedeiro e transcrevendo o RNAv(-) em RNAm(+)⁶⁵. A proteína PB1 forma o núcleo da polimerase, contendo domínios conservados típicos de RdRp, enquanto as subunidades PB2 e PA estão envolvidas no processo de captura do fragmento da porção 5'cap. A PA cliva o pré-RNAm do hospedeiro, 10 a 20 nucleotídeos abaixo da estrutura do cap e a PB2 se liga ao 5' cap do transcrito recém formado⁶⁶. O complexo polimerase é alvo de alguns fármacos antivirais relevantes para o tratamento de infecções com os FluVs.

O quarto segmento dá origem à HA, que é a proteína de superfície mais abundante e principal antígeno do FluV. A molécula de HA é um trímero contendo uma haste formada por tripla fita de alfa-hélice e uma cabeça globular de folha beta antiparalela⁵⁵ (Figura 1.5). Essa proteína é traduzida em sua forma precursora (HA0), que não é capaz de auxiliar na fusão com a membrana celular, sendo então clivada por proteases do hospedeiro, dando origem a HA1 e HA2 (Figura 1.5), que permanecem unidas por pontes dissulfeto. A HA atua na adsorção do vírus, reconhecendo e ligando-se aos resíduos de ácido siálico (AS) da superfície celular⁵⁴ e permitindo a fusão do envelope viral com a membrana interna do endossomo, possibilitando a liberação final das RNPvs no citoplasma celular⁶⁷.

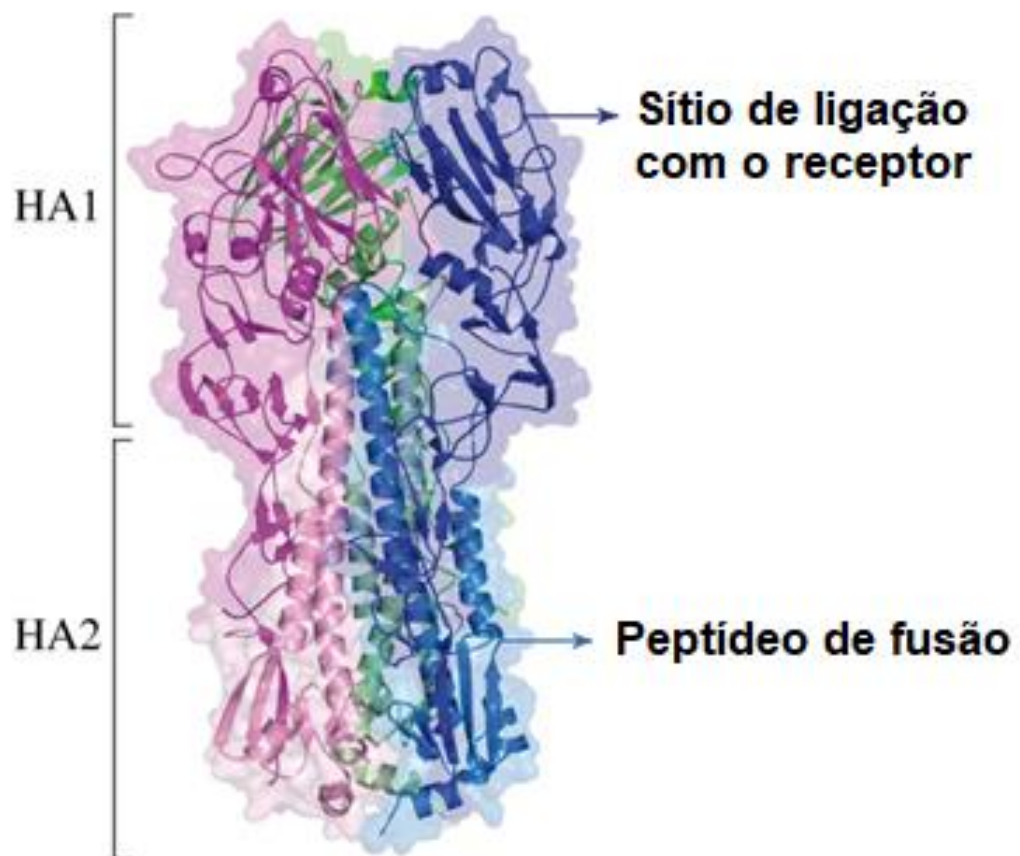


Figura 1.5 - Hemaglutinina do FluAV

Estrutura trimérica da hemaglutinina (HA) do FluAV, com cada monômero (representado por cores diferentes) composto pelo domínio HA1 globular e o domínio HA2 semelhante à haste. A localização de sítio de ligação ao receptor (em HA1) e o peptídeo de fusão (em HA2) estão marcados. Adaptado de Lazniewski *et al.*, 2018⁶⁸.

O quinto segmento gera a NP, componente essencial das RNPvs, se associando ao RNAv e ao complexo polimerase. Após a liberação do material genético viral no citoplasma do hospedeiro, essa proteína também apresenta função de regulação, auxiliando na migração do RNAv até o núcleo⁵⁴.

A NA é a proteína resultante do sexto segmento gênico, também sendo uma glicoproteína de superfície e um dos principais antígenos do FluV. Ela é formada por 4 monômeros idênticos, divididos em cauda citoplasmática, região transmembranar, haste e cabeça catalítica (Figura 1.6). Sua principal função é a clivagem do resíduo de AS associado à HA viral dos novos vírions que são exocitados, liberando então o vírion recém formado para novas infecções⁶⁹, além de facilitar a disseminação do vírus pelo trato respiratório superior por clivar o AS da mucina na mucosa respiratória⁷⁰. A NA é o alvo dos antivirais específicos para o FluV atualmente mais utilizados em todo o mundo, os NAIs.

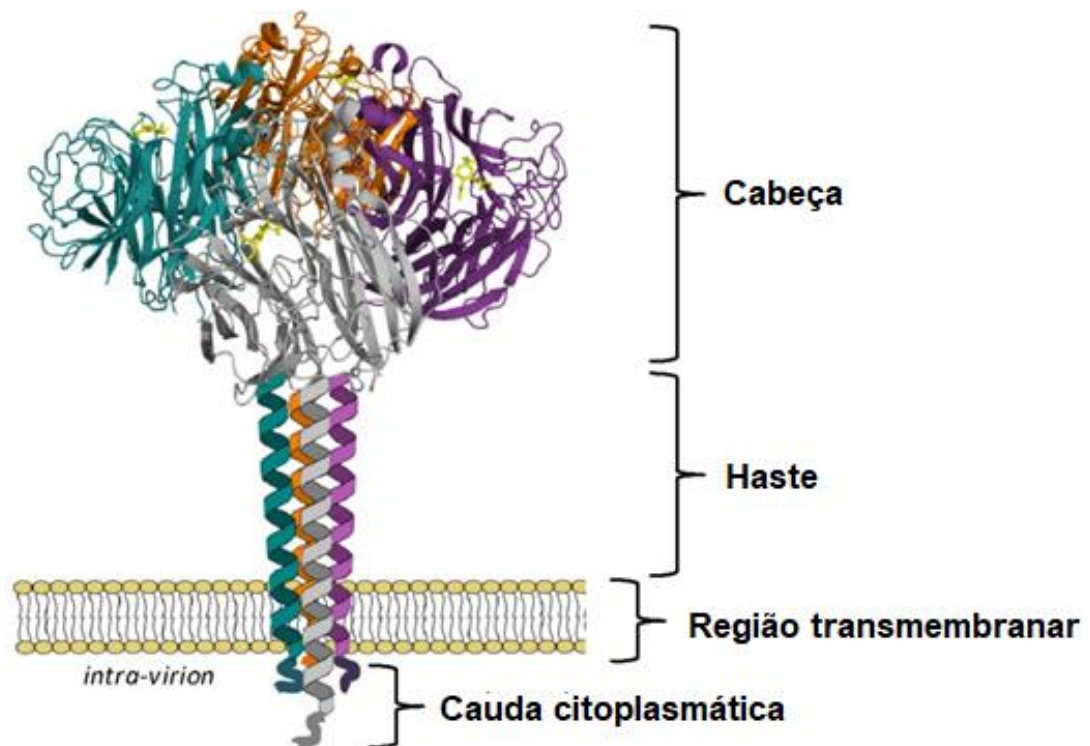


Figura 1.6 - Neuraminidase do FluAV

A neuraminidase (NA) é composta por um tetrâmero de quatro monômeros idênticos em quatro domínios estruturais distintos (cabeça, haste, região transmembrana e cauda citoplasmática). Monômeros do domínio de cabeça são mostrados em cores diferentes. Os domínios restantes ainda não foram elucidados e são representados aqui como 4 alfa-hélices. Adaptado de McAuley *et al.*, 2019⁶⁹.

O sétimo segmento dá origem à MP. Esse gene passa pelo processo de *splicing* alternativo, que resulta nas duas proteínas distintas M1 e M2. A proteína M1 contém três domínios de alfa-hélices agrupadas, separadas por sequências ligantes curtas, com o domínio central mediando a oligomerização e associação com o RNPv⁷¹. A proteína M1 atua como um endoesqueleto, mantendo a integridade e a forma do FluV intacto e organizando estruturalmente a membrana do vírus⁷². Já o M2 forma homo tetrâmeros, onde cada subunidade consiste em um pequeno domínio N-terminal não estruturado, uma hélice transmembranar, constituindo o poro do canal, e uma região intraviral que consiste em uma hélice anfifílica e uma cauda não estruturada (Figura 1.7)⁷³. Sua função é permitir a entrada de prótons, que acidificam o endossomo, engatilhando o processo de fusão da membrana e liberação das RNPvs no citoplasma hospedeiro¹⁷. O canal iônico M2 também é o alvo para a primeira classe de antivirais com atividade contra FluV, os adamantanos.

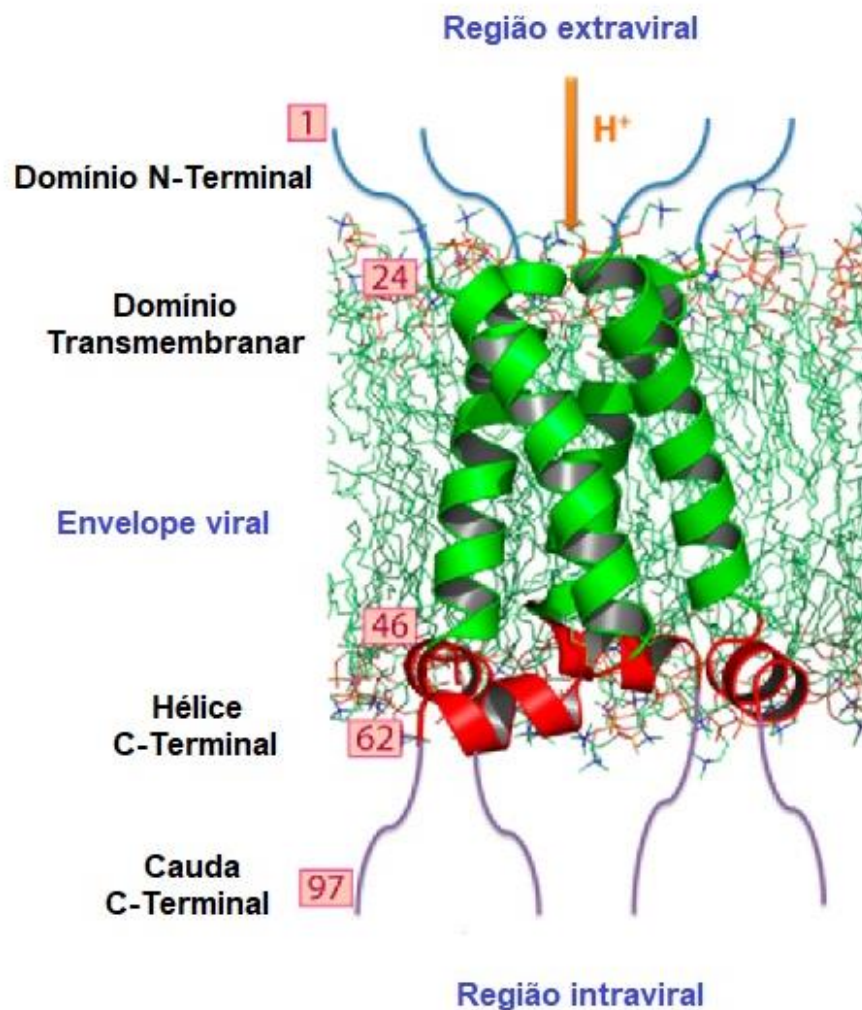


Figura 1.7 - Canal iônico M2

O canal iônico M2 (M2) é formado por homo tetrâmeros com 97 aminoácidos. Cada subunidade consiste em um pequeno domínio N-terminal não estruturado (em azul) (que vai do resíduo 1 ao 24), domínio transmembranar, com uma hélice transmembranar, constituindo o poro do canal (em verde) (resíduo 25 ao 46), e uma região intraviral que consiste em uma hélice C-terminal anfifílica (em vermelho) (resíduo 47 ao 62) e uma cauda C-terminal não estruturada (em lilás) (resíduo 63 ao 97). Adaptado de Schmidt *et al.*, 2013⁷⁴.

Por fim, o segmento 8 expressa a proteína NS1, que é um antagonista do interferon, e, por *splicing* alternativo, codifica as proteínas NEP/NS2, que são envolvidas na migração do material genético viral para o núcleo da célula hospedeira⁵⁵.

1.1.5 Ciclo Replicativo

O principal sítio de replicação dos FluVs, em humanos, é o trato respiratório superior e inferior. A razão desse tropismo é a abundância do receptor AS nas células epiteliais das vias aéreas e alveolar⁷⁵. A HA possui alta afinidade com o AS, realizando a adsorção viral e, conseqüentemente, iniciando o ciclo replicativo. O AS se apresenta ligado à galactose, por ligações glicosídicas do tipo alfa2,3 ou alfa2,6, que interferem na conformação do AS, característica crucial para a ligação do vírus e sua entrada na célula hospedeira⁷⁶. Os vírus que afetam humanos têm maior afinidade com os ASs do tipo alfa2,6, enquanto os vírus que afetam as aves apresentam alta afinidade pelo receptor alfa2,3. No entanto, as células epiteliais respiratórias de suínos expressam AS com ligações alfa2,3 e alfa2,6 e podem, portanto, permitir infecções com cepas de FluV de origem aviária e/ou humana²⁵.

Após a ligação com o receptor, mediada pela HA, é desencadeada a endocitose do vírion. Esse processo pode ocorrer por várias vias endocíticas diferentes como: 1) dependente de clatrina, via mais frequente; 2) dependente de caveolina; 3) vias independentes de clatrina e caveolina ou 4) por macropinocitose⁵⁴. Um vez endocitado, o vírus se encontra em um ambiente mais ácido, devido à absorção de vesículas lisossômicas pelo endossomo⁷⁷. Essa baixa no pH engatilha o processo de mudança conformacional na HA, que insere o poro de fusão na membrana do endossomo, e a ativação dos canais iônicos M2, que permite o influxo de íons H⁺, acidificando ainda mais o ambiente, o que leva ao rompimento das interações entre a proteína M1 e RNPvs e permite a saída das RNPvs do interior do vírus para o citoplasma da célula hospedeira⁶⁴.

Após o desnudamento, ocorre a etapa de migração das RNPvs para o núcleo, que é uma peculiaridade dos FluVs em relação aos demais vírus de RNA. Esse processo utiliza a maquinaria e vias de transporte da célula hospedeira. A proteína NP emite sinais de localização nuclear, para recrutar os fatores de importação celular, como as importinas α e β , que direcionam as RNPvs para o núcleo^{54,64}.

No núcleo, inicialmente, o genoma viral é replicado, formando o RNA complementar (RNAc), que, no final da sua extensão da sua fita, associa-se a um complexo polimerase e à NP recém formadas, gerando a RNP complementar (RNPc)⁷⁸. A exportação das RNPcs para o citoplasma é realizada através da ligação à M1, que atua como proteína adaptadora da RNP, e à NEP/NS2, que exporta todo esse complexo para o citoplasma⁵⁵.

A transcrição dos RNAs do FluV é realizada pelo complexo polimerase. No início do processo, a unidade PB2 se liga à estrutura *cap* e aproximadamente de 10 à 20 nucleotídeos após essa ligação, a PA cliva a fita de RNA do hospedeiro e utiliza esta porção de RNA obtida como iniciador da síntese do RNA viral, processo conhecido como *cap-snatching*⁷⁹. Em seguida, a PB1, que possui a atividade de polimerase, adiciona os nucleotídeos, concluindo a extensão da nova fita de RNA. Após, o RNA é exportado para o citosol, onde é traduzido pelos ribossomos⁵⁵.

A tradução dos RNAs é dividida entre ribossomos no citoplasma, para as proteínas PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 e M1, e ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER), para as proteínas de membrana HA, NA e M2⁶⁴. Após sua tradução, as proteínas M1, NEP, NS e o complexo polimerase possuem sinal de localização nuclear e migram para o núcleo antes de irem para a membrana celular⁸⁰. Entretanto, as proteínas HA, NA e M2 precisam passar pelo complexo de Golgi, onde recebem o peptídeo sinal para que sejam empacotadas e direcionadas para a membrana celular, para posterior montagem da progênie viral⁵⁵. A exocitose do vírus recém montado ocorre pelo mecanismo de brotamento, utilizando parte da membrana do hospedeiro como envelope viral. Em seguida, o vírus fica ancorado na membrana citoplasmática do hospedeiro, devido a ligação entre o AS e a HA e sua liberação depende da atividade de sialidase da NA, que cliva essa ligação liberando as novas partículas virais para que estas possam infectar novas células (Figura 1.8).

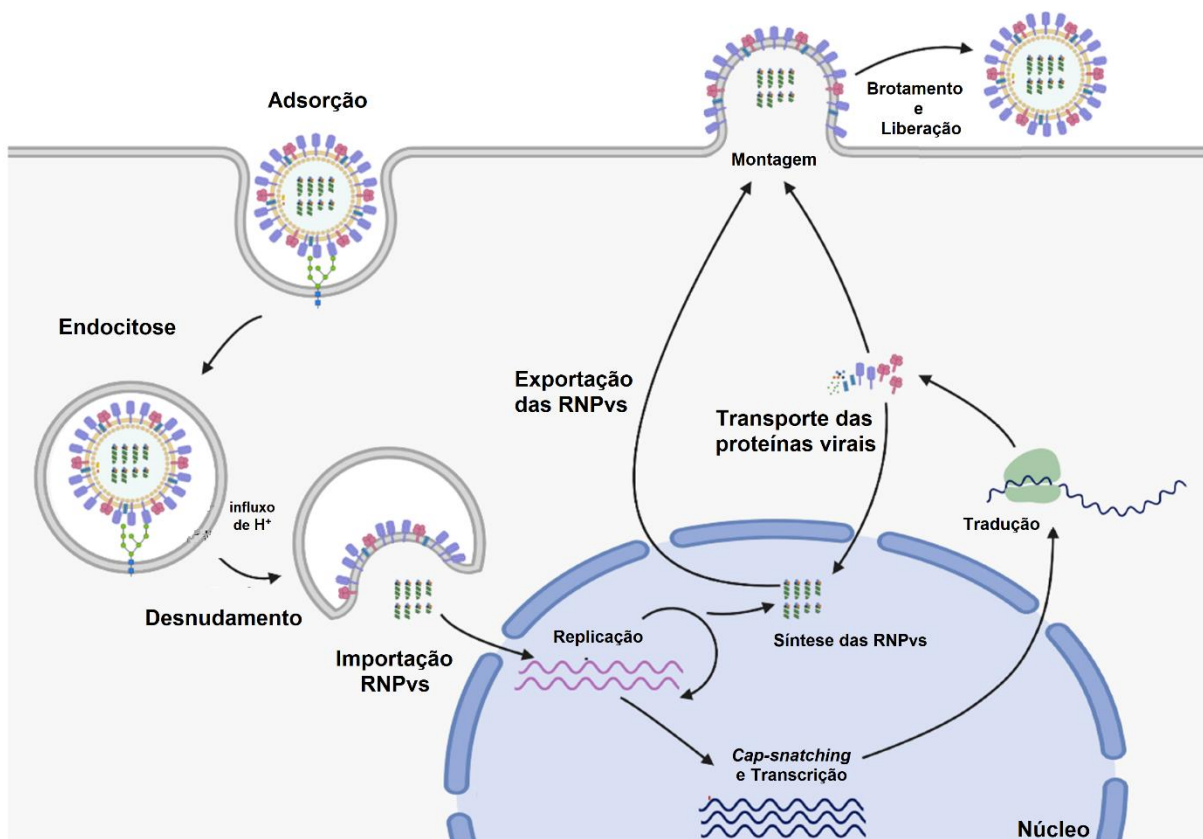


Figura 1.8 - Esquema do ciclo replicativo do vírus FluAV.

FluAV adsorve e liga-se aos resíduos de ácido siálico da célula do hospedeiro, com auxílio da hemaglutinina. Após a endocitose, o vírus encontra um ambiente mais ácido, o que gera uma modificação conformacional na HA, que expõe o poro de fusão com a membrana. Essa mudança no pH ativa abertura do canal iônico, que inicia um processo de influxo de H^+ , que engatilha a dissociação das RNPVs da proteína M1, liberando as RNPVs no citoplasma. As RNPVs migram para o núcleo através da interação da proteína NP e as importinas. No núcleo, onde o complexo polimerase vai realizar a replicação do genoma viral e, simultaneamente, o processo de *cap-snatching*, seguido da transcrição. O RNAm formado é levado ao citoplasma, onde é traduzido. As recém-formadas RNPVs são exportadas do núcleo com auxílio das proteínas M, NP e NEP, enquanto novas moléculas de NA, HA e M2 são enviadas pelo complexo de Golgi para a membrana citoplasmática, onde ocorrerá a montagem do novo vírion. Ao final da montagem, o novo vírus é exocitado da célula hospedeira e a NA cliva a ligação da HA ao resíduo de ácido siálico, liberando o novo vírion para infecção de novas células. FluAV – vírus influenza A. HA – Hemaglutinina. RNPVs – Ribonucleoproteínas virais. NP – Nucleoproteína. RNAm – RNA mensageiro. NEP – Proteína de Exportação Nuclear. NA – Neuraminidase. Adaptação de Jung & Lee, 2020⁸¹.

1.1.6 Evolução viral

Devido as suas características genéticas, como seu genoma segmentado e composto por RNA, os FluVs estão em constante evolução. Sua polimerase não possui a característica de realizar o processo de revisão dos nucleotídeos inseridos, aumentando a frequência de mutações (na casa de 1 base errada a cada 10^4 bases

inseridas), o que é crucial para sua variabilidade^{82,83}. Esse aumento de variabilidade é importante para continuidade da circulação do vírus, aumentando a possibilidade de escape do sistema imune do hospedeiro e melhora do *fitness* viral (capacidade de replicação e transmissão), e até mesmo de resistência aos fármacos antivirais. Porém, algumas mutações podem apresentar efeitos silenciosos ou até prejudiciais à cepa em questão. A evolução destes vírus é influenciada principalmente por dois mecanismos, o *drift* antigênico e o *shift* antigênico (Figura 1.9)⁸⁴.

O *drift* antigênico é um fenômeno no qual são inseridas mutações pontuais no genoma do vírus e está relacionado com os erros da RNA polimerase viral, no processo de síntese de novas fitas de RNA. Já foram descritas mutações pontuais nos genes de todas as principais proteínas dos FluAVs, porém são mais frequentes nas HA e NA, que são menos conservadas. Essas mutações podem levar à tradução de proteínas com efeito diferente das proteínas do vírus selvagem, como no caso da HA com a substituição G186V, que leva à maior afinidade de cepas aviárias pelo receptor de humanos⁸³, ou com mutações no sítio 222 da HA, associadas com aumento da severidade da doença⁸⁵. Além da HA, mutações nos genes responsáveis pelas proteínas alvos dos antivirais, como M2, NA e PA, são importantes e têm sua frequência monitoradas constantemente⁸⁶⁻⁹⁰.

O *shift* antigênico ocorre quando duas ou mais cepas de FluV infectam a mesma célula de um hospedeiro, podendo acontecer a recombinação de seu material genético, um evento que ocasionalmente gera uma nova cepa, com uma nova combinação de HA e NA. Esse fenômeno é bastante relevante, pois cepas de origens distintas podem sofrer rearranjo, como é o caso de cepas oriundas de aves e humanos, podendo emergir uma nova cepa com potencial pandêmico, como visto nas últimas pandemias de FluAV. Semelhante ao *drift* antigênico, o *shift* também é monitorado constantemente. Nos últimos anos, foram detectadas, no Brasil, cepas de A(H1N2) infectando humanos^{41,91}, porém não foi observada a disseminação dessa nova cepa pela comunidade.

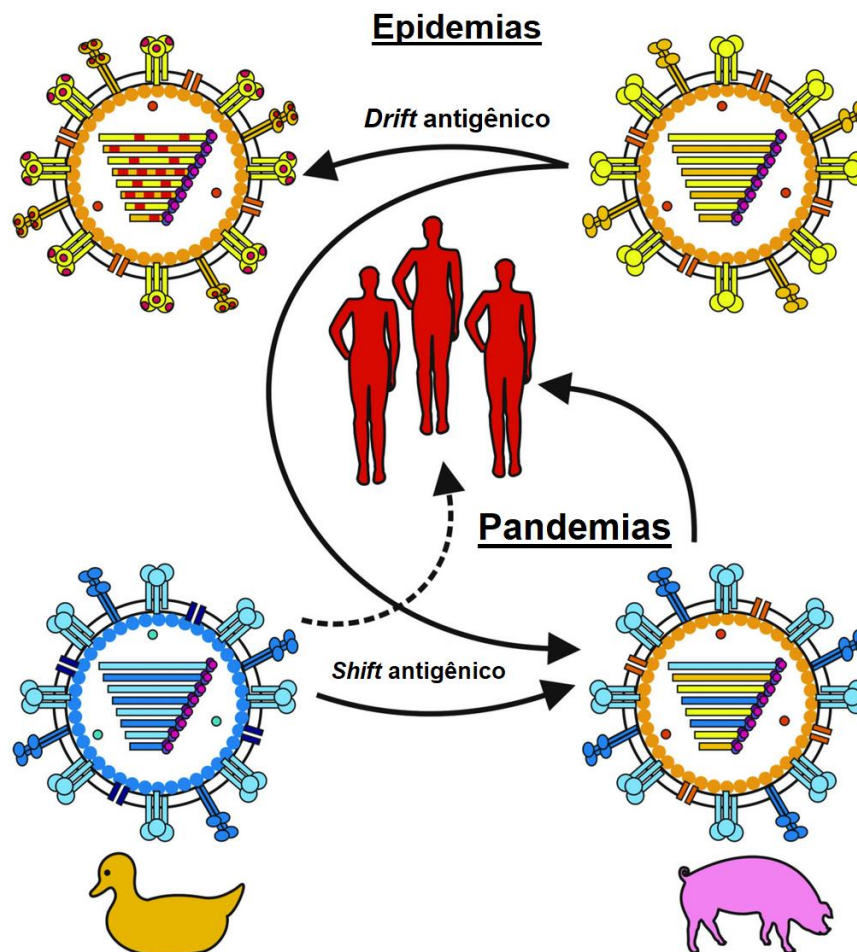


Figura 1.9 - Mecanismos de evolução do vírus influenza por *drift* e *shift* antigênicos.

Esquema representando como ocorrem os principais mecanismos de evolução dos FluAV. Drift antigênico, ocorre por mutações pontuais no genoma viral, principalmente nas regiões mais variáveis como nas glicoproteínas HA e NA, que pode levar ao escape da resposta imune do hospedeiro, aumento da gravidade da doença e redução da atividade antiviral de fármacos. Shift antigênico, ocorre quando duas ou mais cepas, podendo ser de espécies diferentes, infectam a mesma cepa, podendo acontecer o rearranjo de genes, criando um vírus. O destaque para os suínos que possuem os receptores $\alpha 2,3$ (preferência dos vírus de origem aviária) e $\alpha 2,6$ (preferência dos vírus de origem humana), e podem agir como um grande misturados gênico, como visto na pandemia de 2009. Adaptação de Sandt, Kreijtz & Rimmelzwaan, 2012⁹²

1.1.7 Resposta imune do hospedeiro contra infecções por FluAV

Os FluAVs podem afetar todo o trato respiratório humano, sendo o alvo primário as células epiteliais da mucosa respiratória. Todavia, existem outras células presentes nos alvéolos pulmonares, como macrófagos e células dendríticas, que também podem ser infectadas pelo FluAV, porém não produzindo progênie viral, sendo considerada uma infecção abortiva⁹³.

A resposta imunológica contra FluV é iniciada nas vias aéreas, sendo a resposta imune inata, que é uma resposta rápida, mas inespecífica, a primeira linha de defesa. Assim, as células infectadas reconhecem os PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) virais através dos PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), geralmente dos tipos RIG-I (do inglês, *Retinoic acid inducible gene-1*), TLR (do inglês, *Toll-like receptors*) e do tipo NOD (do inglês, *nucleotide oligomerization domain*; NLRs, *Nod-like receptors*), que ativam diferentes cascatas de sinalização e ativando diferentes citocinas pro-inflamatórias⁹⁴.

Em paralelo, a resposta pró-inflamatória é responsável pelo recrutamento de células efetoras, que ajudam a eliminar o vírus, e de células da imunidade adaptativa. Após o reconhecimento do patógeno, as células infectadas expressam citocinas antivirais e quimiotáticas, como interferons (IFNs), fatores de necrose tecidual (TNF) e interleucinas (ILs)²⁰, que podem recrutar células inatas efetoras, como células NK (*natural killer*), células dendríticas, monócitos e neutrófilos. As células recrutadas têm seu próprio mecanismo para interagir com células infectadas e limitar a replicação viral, além de preparar células imunes adaptativas para imunidade e memória específicas do antígeno⁹⁵.

Uma das principais citocinas da resposta imune inata é o IFN, que regula a replicação viral mediando a sinalização antiviral, ao estimular a expressão de genes que codificam proteínas com atividade antiviral (ISGs, do inglês *interferon stimulated genes*)⁹⁶. Os ISGs atuam em diferentes etapas do ciclo replicativo do FluAV, como na restrição da entrada viral nas células pela família MxA (do inglês, *Myxovirus Resistance*), família de proteínas transmembranar induzidas por interferon (IFITMs), colesterol 25-hidroxilase (CH25H) e proteínas TRIM (da família *Tripartite Motif*)⁹⁴.

Entretanto, o FluAV desenvolveu alguns mecanismos de escape de resposta imune inata. A proteína NS1 atua como antagonista do IFN⁹⁷, além de estimular vias de sinalização que aumentam a eficiência da replicação viral⁹⁸. A proteína PB2 inibe a expressão de IFN e interage com proteínas mitocondriais, interferindo na regulação da resposta antiviral inata²⁰.

A segunda linha de defesa contra a infecção por FluAV é a resposta imune adaptativa (celular e humoral). Na primeira exposição ao patógeno, essa resposta, que é altamente específica, é mais lenta do que a resposta inata. Porém, a partir da segunda exposição, o indivíduo infectado já possui memória imunológica e essa resposta é mais rápida, forte e eficaz.

A resposta adaptativa celular utiliza os linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para o vírus. Para serem ativadas, as células T CD4+ precisam já terem sido previamente apresentados ao antígeno pelas células apresentadoras de antígenos⁹⁹. A resposta destas células pode ser do tipo Th1, com expressão de IFN γ e IL-2, que auxiliam na ativação dos macrófagos, na resposta dos linfócitos T CD8+ citotóxicos (TCLs) e induzem as células T CD8+ de memória⁹⁹. A resposta tipo Th2 produz IL-4, IL-5 e IL-13 e auxilia a mudança de classe de anticorpos nos linfócitos B⁹². Já os TCLs atuam diretamente eliminando as células infectadas pelos vírus^{92,99}.

Na imunidade adaptativa humoral, os linfócitos B sintetizam anticorpos específicos contra as principais proteínas do vírus. Os anticorpos direcionados às HA e NA virais se correlacionam com a imunidade protetora²⁰, no entanto, a maioria dos anticorpos contra HA são específicos da cepa do FluV e não conseguem neutralizar as variantes derivadas do processo de *drift* antigênico e os vírus de outros subtipos⁹².

1.1.8 Prevenção e Controle

Atualmente, duas principais estratégias são usadas para controlar as infecções por FluV: a vacinação e o tratamento com fármacos antivirais.

A principal estratégia de saúde pública para conter o FluV é a vacinação anual, com atualização frequente das cepas presentes nas vacinas. Esta é a ferramenta mais efetiva para o controle de infecções da doença, especialmente para redução das infecções graves, além de ser uma alternativa com menor custo do que o tratamento com fármacos e/ou custo com hospitalizações. A vacinação, no Brasil, é disponibilizada para pacientes do grupo de risco ou indivíduos com alto risco de exposição.

O primeiro registro sobre a vacinação para FluV aconteceu na década de 40, na qual houve dois principais objetivos: proteger contra o desenvolvimento da doença e alcançar altas taxas de população vacinada para aumentar a proteção das pessoas não vacinadas¹¹. Essa primeira versão da vacina era composta de vírus inativado, monovalente (somente um subtipo de FluAV)¹⁰⁰ e produzida em cultura de ovos embrionados. Após a descoberta dos outros tipos e subtipos de FluV, sua composição foi sendo reformulada, até chegar ao atual formato.

Nos dias atuais, dois principais tipos de vacinas contra FluV são aprovados para uso: as de vírus inativados e as de vírus atenuados. As vacinas com vírion inativado, que são as mais comumente utilizadas atualmente, podem ser de vírion inteiro, particulado ou de subunidades. Para a produção da vacina de vírion inteiro, os

vírus são purificados e inativados quimicamente com formaldeído ou β -propiolactona. A administração desta vacina é via intramuscular. Essas vacinas podem ser trivalentes, contendo antígenos de duas cepas de FluAV, A(H1N1)pdm09 e A(H3N2), e uma linhagem de FluBV (*Yamagata* ou *Victoria*), ou quadrivalente, contendo uma linhagem adicional de FluBV. Na vacina de vírion particulado, o envelope do vírion é rompido pelo tratamento com éter dietílico ou detergente, enquanto que nas vacinas de subunidades, incluem-se as glicoproteínas HA e NA, que são ainda mais purificadas para exclusão do restante do material viral¹⁰¹. As vacinas de vírus atenuados são geralmente produzidas como o vírus A(H2N2) e rearranjadas com as cepas recomendadas pela WHO para aquela temporada. Essas cepas são adaptadas para crescimento a 25°C, limitando assim a disseminação no hospedeiro humano. Sua administração é pela via intranasal e seu público alvo são crianças, sendo utilizada nos EUA e Europa¹⁰².

Apesar do seu sucesso e relevância, a vacinação contra FluV ainda possui algumas limitações. Uma vez que os FluVs estão em constante evolução, mutações vão se acumulando no genoma viral ao longo do ano, principalmente pelo mecanismo de *drift* antigênico, trazendo modificações nos principais antígenos virais, as glicoproteínas HA e NA. Este fenômeno pode impactar na eficácia e disponibilidade vacinal¹⁰³ e, com isso, existe a necessidade da atualização das cepas vacinais regularmente, o que é coordenado pela WHO¹⁰⁴. Além disso, a vacina pode gerar proteção insuficiente para alguns pacientes de grupos de risco, como os imunocomprometidos¹⁰⁵, e sua efetividade é diferente para cada cepa circulante, sendo menor contra A(H3N2), comparada com A(H1N1) e FluBV¹⁰⁶. Ademais, as crescentes tendências de ignorância em relação à incerteza das vacinas estão levando à redução na cobertura vacinal¹⁰⁷.

Além da vacinação, a outra estratégia para controle de infecções por FluV é o tratamento com fármacos antivirais. A primeira linha de antivirais com atividade contra influenza alveja as proteínas virais, agindo em diferentes fases do ciclo replicativo do vírus. Até então, existem três classes antivirais aprovadas para uso com atividade anti-influenza: os adamantanos, os NAIs e inibidores do complexo polimerase.

Esses fármacos são utilizados como tratamentos da infecção, podendo reduzir o tempo de duração dos sintomas¹⁰⁸ e melhorar os desfechos clínicos^{109,110}. Além disso, o tratamento antiviral é uma importante opção para profilaxia contra os FluV, em casos específicos¹¹¹. Adicionalmente, os antivirais são importantes ferramentas de controle da doença, principalmente no caso de uma epidemia ou pandemia, causada

por uma nova cepa viral, uma vez que o desenvolvimento de uma vacina efetiva requer, pelo menos 06 meses, utilizando o método convencional, baseado em crescimento dos vírus em ovos embrionados, o que não impedirá a disseminação inicial da infecção, sendo então, o uso de fármacos a primeira linha de defesa até que a vacina adequada esteja disponível. Ademais, a menor efetividade vacinal em imunossuprimidos e idosos torna a associação de tratamento com os antivirais importante para esses indivíduos.

1.1.9 Inibidores do canal iônico - adamantanos.

A primeira geração de fármacos com atividade anti-influenza é dos inibidores do canal iônico, também conhecidos como adamantanos e bloqueadores do canal M2, e tem como representantes os fármacos amantadina e rimantadina (Figura 1.10), que são aminas derivadas do hidrocarboneto adamantano.

O legado desta classe antiviral inicia-se em 1966, quando o fármaco cloridrato de amantadina teve sua liberação de uso para tratamento de infecções e profilaxia do vírus¹¹². Já o fármaco cloridrato de rimantadina, teve sua liberação para uso em 1994, sendo de estrutura análoga à amantadina (figura 1.10), apresentando a premissa de apresentar maior eficiência contra infecções de FluAV e causar menos efeitos colaterais¹¹². Os adamantanos foram amplamente utilizados por décadas devido a sua ampla disponibilidade e baixo custo. Esses fármacos apresentavam eficácia de profilaxia variando entre 80% e 90%, e seu uso podia reduzir a duração da doença em 1,5 dias se o tratamento fosse iniciado dentro de 48 horas após a infecção¹¹³.

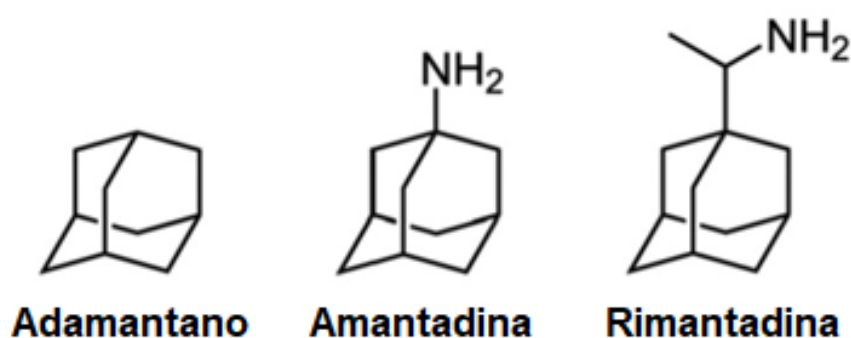


Figura 1.10 - Estrutura dos fármacos adamantanos e seus derivados amantadina e rimantadina.

Fonte: Adaptado de Król, Rychłowska & Szewczyk, 2014¹¹⁴

O mecanismo de ação dos adamantanos consiste em bloquear o canal iônico M2, inibindo a atividade do canal, desta forma, interrompendo os estágios iniciais da

replicação viral (Figura 1.11). O canal M2 foi escolhido como alvo antiviral por desempenhar um papel essencial para o vírus e ser relativamente conservado entre as cepas de FluAV. Para bloquear o canal M2, os adamantanos utilizam um hidrocarboneto e uma amina primária, que se ligam ao poro do canal iônico por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas no topo do resíduo H37, dessa maneira inibindo o canal e interrompendo o ciclo replicativo do vírus¹¹⁵.

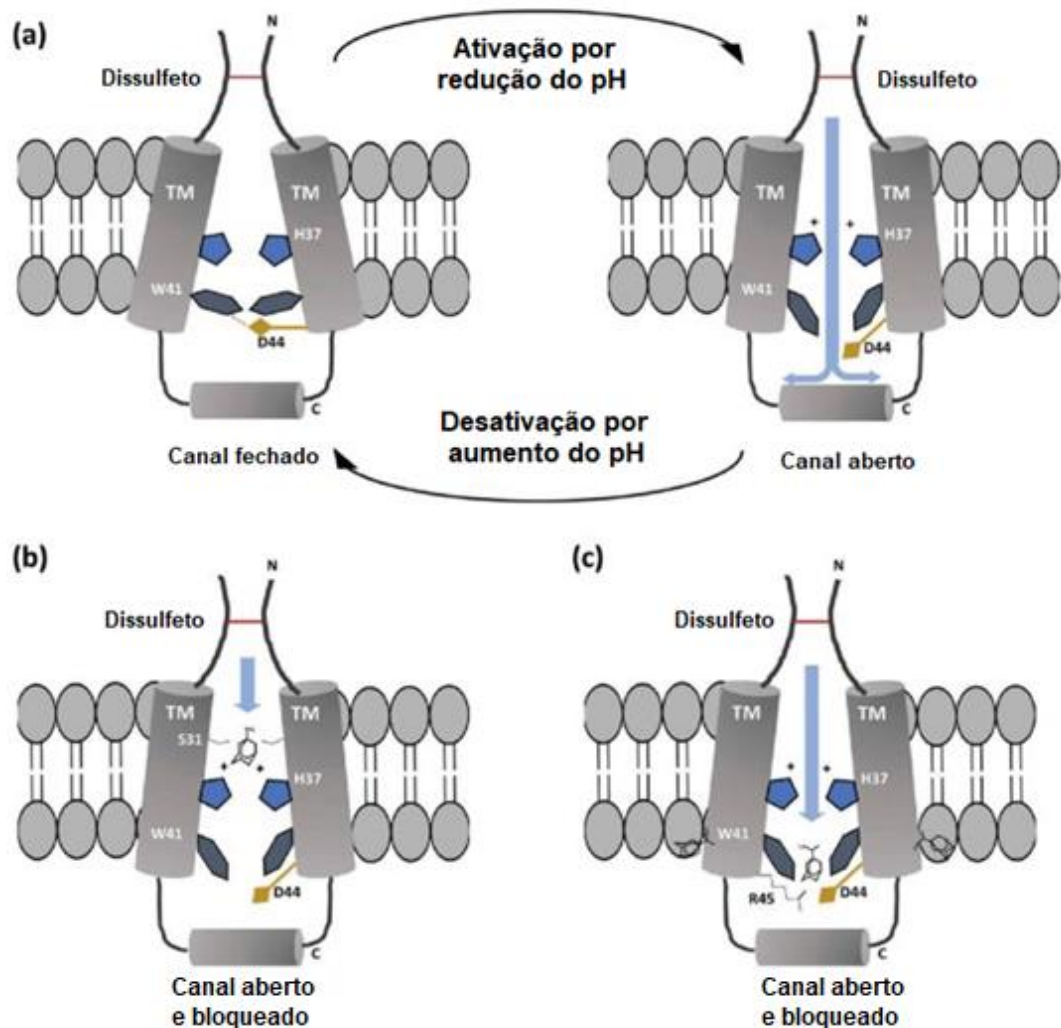


Figura 1.11 - Mecanismo de ação dos inibidores do canal iônico M2.

A) A acidificação do endossomo engatilha o processo de abertura do canal M2, permitindo a entrada de prótons em direção a sua cauda C-terminal. B) Mecanismo de ação do fármaco amantadina, que se liga ao canal, bloqueando o fluxo de prótons. C) Mecanismo de ação do fármaco rimantadina, que se liga ao canal, bloqueando o fluxo de prótons. Adaptado de Shin & Seong 2019¹¹⁶.

A amantadina, em casos de infecções por FluAV, deve ser administrada em via oral, duas vezes ao dia, durante 5 dias, exceto para paciente idosos em que é administrada uma vez ao dia¹¹⁷. Após, o fármaco é rapidamente absorvido, apresentando biodisponibilidade de 86-94%, atingindo níveis plasmáticos máximos

em 4 horas. A meia-vida de eliminação plasmática é de 11-15 horas¹¹⁸. Após sua metabolização, é quase totalmente excretado por filtração glomerular e secreção tubular, o que implica em ajuste de dose em pacientes com insuficiência renal ou em idosos¹¹⁹. Este fármaco consegue atravessar as barreiras hematoencefálica e placentária, estando presente também no leite materno e apresentando efeito teratogênico, sendo então excluído para grávidas¹¹⁹. Seus efeitos adversos são mais frequentes quando administrado por algumas semanas, para fins profiláticos¹¹⁹.

A rimantadina é indicada para profilaxia e tratamento de infecções causadas pelo FluAV, demonstrando vantagens com relação à amantadina por causar menos efeitos adversos, pois apresenta menor toxicidade ao sistema nervoso central (SNC)¹²⁰. Seu uso, em adultos, é realizado através da via oral, duas vezes ao dia, por 05 dias¹²¹. Esse fármaco atinge o pico de concentração plasmática após 3-6 horas, com meia-vida plasmática de 24-36 horas. Quando comparado com amantadina, é mais eficientemente metabolizado pelo fígado, pois somente 25% do fármaco é excretado pelos rins sem alterações¹¹⁹.

1.1.10 Resistência aos inibidores do canal iônico.

A principal desvantagem do uso dos adamantanos é que a emergência de cepas de FluAV resistentes ocorre rapidamente¹²². Estudos *in vivo* e clínicos mostraram que a ocorrência de variantes de FluAV apresentando redução de susceptibilidade (RS) à amantadina, após a exposição às drogas é um evento frequente¹²³. Durante o uso clínico, a resistência aos adamantanos foi detectada em cerca de 30% dos pacientes após 2-3 dias de tratamento¹²³. Além disso, as variantes resistentes a medicamentos podem replicar tão eficientemente quanto as sensíveis e também podem apresentar transmissão com alta eficiência entre indivíduos sem redução significativa de patogenicidade¹²³. Outra preocupação é a existência da resistência cruzada completa entre amantadina e rimantadina, uma vez que as mudanças genéticas que ocorrem no canal iônico M2, afetam a sensibilidade de ambos fármacos¹²⁴. Para mitigar a emergência e o espalhamento de variantes de FluAV com perfil de RS aos adamantanos, o uso combinado com fármacos de outras classes, como o OST, foi avaliado e seus efeitos antivirais sinérgicos foram confirmados¹²⁵.

As mutações associadas à RS aos adamantanos são observadas na sétima RNPv, no segmento que dá origem à proteína M2. A resistência dos FluAVs aos adamantanos foi detectada pela primeira vez durante um surto na década de 1980 e

se manteve baixa (<2%) até os anos 2000, quando começou a aumentar vertiginosamente. Durante as temporadas de influenza de 2005-2006, as cepas de A(H3N2) resistentes aos adamantanos alcançaram mais de 90% de frequência, evento que, nos anos seguintes, também foi visto com os outros subtipos de FluAV, como foi o caso da cepa pandêmica A(H1N1)pdm09, que emergiu em 2009 já resistente aos bloqueadores de M2¹²⁶.

A resistência a esta classe de fármacos está diretamente associada às substituições S31N, L26F, V27A, A30T/V, G34E e L38F na proteína M2 dos FluAVs¹²⁷⁻¹²⁹. Destas, a mutação S31N é a mais relevante e frequentemente detectada nas cepas virais pesquisadas, apresentando distribuição mundial¹³⁰. Estudos apontam que a causa mais provável deste fenômeno foi o uso exacerbado dos adamantanos em alguns países, uma vez que esses fármacos eram comercializados sem prescrição médica¹³¹, dentre outras causas¹³².

Apesar dos vírus atualmente circulantes serem resistentes a esta classe de fármacos, em 2017, foram detectados, na Austrália, alguns grupos de vírus (*clusters*) sensíveis aos fármacos adamantanos, por não apresentarem a alteração S31N¹³³. Tal achado reacendeu a discussão sobre um possível retorno da utilização dessa classe, caso esses vírus viessem a se disseminar novamente.

Enquanto isso, a comunidade científica continua buscando o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos bloqueadores do canal M2 que seja eficaz contra os FluAVs circulantes atualmente¹¹⁵.

1.1.11 Inibidores de Neuraminidase (NAIs).

A segunda classe de fármacos aprovada para uso contra FluV foram os NAIs, que são, atualmente, os compostos anti-influenza mais utilizados em todo o mundo. Essa classe é recomendada para uso contra todos os subtipos de FluAV e as 2 principais linhagens de FluBV e, até o momento, existem quatro fármacos representantes: o oseltamivir (OST), o zanamivir (ZAN), o peramivir (PER) e o laninamivir (LAN) (Figura 1.12). Os fármacos OST e ZAN são licenciados mundialmente para uso no tratamento de infecções por FluV, enquanto o PER está liberado somente na China, Japão, Coreia do Sul e EUA; e o LAN apenas no Japão. Os NAIs são eficazes em acelerar a eliminação do vírus, diminuindo o tempo de alívio dos sintomas, além de encurtar a duração da doença clínica, reduzindo o tempo de internação hospitalar e mortalidade¹³⁴. Esses fármacos apresentam melhores resultados clínicos, principalmente quando iniciados precocemente (até 48 horas do

início dos sintomas)^{135,136}. Além disso, os NAIs desempenham um papel importante na profilaxia contra os FluVs, principalmente em surtos, epidemias e pandemias¹³⁷.

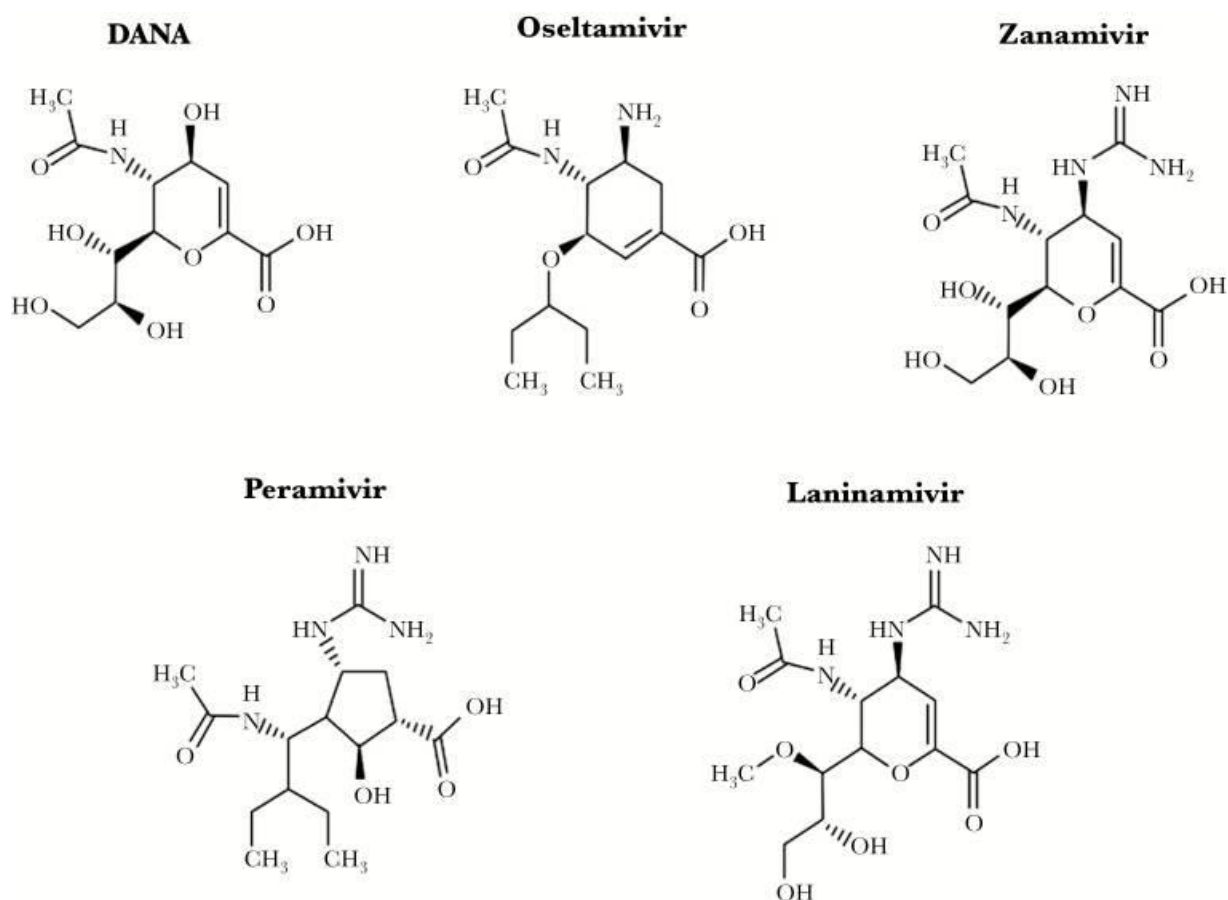


Figura 1.12 - Estrutura molecular dos fármacos NAIs.

Estrutura molecular do oseltamivir, zanamivir, peramivir e laninamivir, além do fármaco DANA, que deu origem aos fármacos citados. Adaptado de Abed & Boivin, 2017¹³⁸.

Os NAIs são análogos estruturais do estado de transição dos receptores AS e agem competindo com os AS pelas interações com a NA viral¹³⁹. A ideia de um fármaco antiviral alvejando a NA, foi considerada desde o ano de 1948¹⁴⁰, mas somente na década de 1970 que foi reconhecida a capacidade de análogos sintéticos dos ASs, como o composto ácido 2,3-didesidro-2-desoxi-D-N-acetilneuramínico (Neu5Ac2en ou DANA) (FIGURA 1.11) de inibir a atividade da NA viral^{135,141}. A partir da estrutura do DANA¹⁴² e com maiores entendimentos sobre a NA, teve origem o desenvolvimento dos primeiros NAIs realmente eficazes, o ZAN e OST.

O mecanismo de ação dos NAIs consiste em bloquear a NA viral, ligando-se aos resíduos essenciais para sua atividade enzimática¹⁴⁰. Consequentemente, os

vírus recém-formados permanecem ligados à membrana celular do hospedeiro, impedindo que se espalhem para as células vizinhas (Figura 1.13).

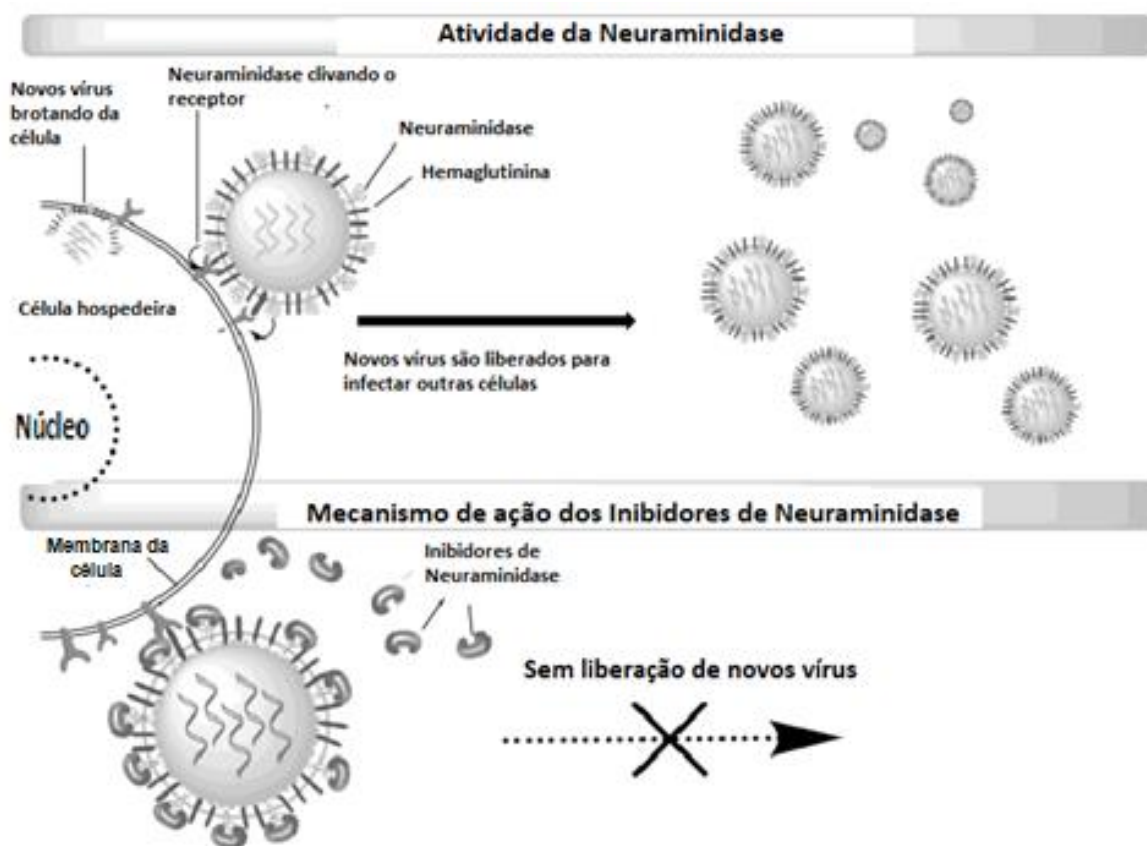


Figura 1.13 - Atividade da NA e mecanismo de ação dos NAIs

O esquema representa dois cenários. O primeiro, acima, mostra a atividade da NA durante a infecção viral. Após o brotamento do novo vírus, a NA cliva o resíduo de AS ligado a HA, liberando o vírus para novas infecções. Abaixo, o esquema demonstra o mecanismo de ação dos fármacos NAIs, os quais se ligam na NA, não permitindo que os mesmos exerçam a função de clivagem do receptor, sem liberação de novos vírus. Adaptado de Singh, Anjum & Chandra, 2019¹⁴³.

O primeiro NAI a ser licenciado foi o ZAN, em julho de 1999¹⁴⁴. Esse fármaco é aprovado para uso com administração via inalação¹¹⁹. Sua dose recomendada é de 10mg, duas vezes ao dia, durante 5 dias, enquanto a profilaxia é administrada uma vez por dia durante 10 dias¹⁴⁵. Em relação às características farmacocinéticas, o ZAN é um composto altamente hidrofílico, não é bem absorvido pela via entérica e possui uma baixa biodisponibilidade (2%). Por essas razões, é administrado por inalação no formato de pó seco, sendo 10-12% da dose inalada absorvida. Sua meia vida plasmática é de 2,5-5,1h. Embora o ZAN seja bem tolerado e tenha poucos efeitos adversos, sua via de administração pode representar uma limitação para uso em crianças e idosos que não inalem o ZAN adequadamente¹⁴⁶. Adicionalmente, devido à baixa circulação sistêmica deste fármaco, a formulação de pó seco não é recomendada para o tratamento de formas graves de influenza¹¹⁴.

O segundo fármaco da classe dos NAIs a ser licenciado foi o OST, em outubro de 1999¹⁴⁴, sendo, atualmente, o antiviral contra FluV mais utilizado em todo mundo. Em comparação ao ZAN, possui grande biodisponibilidade¹⁴². Seu uso é recomendado para prevenção e tratamento de infecção por FluAV e FluBV, para todas as formas da doença (branda ou grave), via oral, através de comprimidos, nos quais são prescritos por 5 dias, 2 vezes ao dia, para tratamento e 1 vez ao dia, para prevenção. O OST também é recomendado para bebês e crianças entre 1 e 12 anos, com ajuste de dose, sendo também seguro em mulheres grávidas e lactantes¹³⁷.

O OST é administrado como fosfato de oseltamivir, que é um pró-fármaco. Após a ingestão, o mesmo é rapidamente absorvido e convertido em sua forma metabólica ativa, o carboxilato de oseltamivir (CO), que atinge o pico de concentração plasmática após 3-4h e apresenta meia vida plasmática de 6-10h¹³⁷. Este fármaco apresenta excelente biodisponibilidade (80%) e alta distribuição (23–26L), o que permite que o OST alcance todos os locais de infecção (pulmões, traqueia, mucosa nasal, seios da face e ouvido médio), podendo também alcançar o SNC. Sua metabolização é realizada pelas esterases hepáticas, sendo eliminado pela urina¹³⁵.

O OST é bem tolerado, mas efeitos adversos brandos podem ocorrer. Mais raramente, podem ocorrer sintomas neuropsiquiátricos¹⁴⁷. Em caso de contraindicações para OST ou em caso de resistência viral, o uso do ZAN ou combinações de antivirais devem ser considerados.

A classe dos NAIs também conta com os fármacos PER e LAN. Porém, esses fármacos possuem o uso restrito a pouco países, não sendo aprovados no Brasil até o momento. O PER, atualmente, é o único antiviral contra FluV administrado somente por via intravenosa, enquanto o LAN é utilizado por inalação. O uso desses fármacos na clínica ainda é bastante limitado, porém são utilizados como opção aos NAIs clássicos, principalmente para tratamento de cepas resistentes aos demais compostos¹³⁷.

1.1.12 Resistência aos NAIs

Devido à experiência anterior de surgimento de resistência viral aos adamantanos, começou a ser realizado um monitoramento intenso para detectar variantes resistentes aos NAIs. Então, no ano de 1999, ano de licenciamento do ZAN e OST, foi estabelecida a Rede Global de Monitoramento da Susceptibilidade aos NAIs, com o objetivo de determinar as diretrizes dos testes de sensibilidade e monitorar a susceptibilidade e resistência aos NAIs das amostras de influenza

coletadas em todo o mundo¹. Desde a temporada 2012-2013, vem sendo realizada a Vigilância Global da Susceptibilidade aos NAIs pelo grupo de trabalho composto por especialistas da GISRS/ WHO⁸⁶.

O mecanismo de RS aos NAIs está relacionado com mutações na NA viral. As NAs são divididas em três grupos filogenéticos: NA dos vírus FluBV; grupo 1 (N1, N4, N5 e N8) e grupo 2 (N2, N3, N6, N7 e N9) NA dos FluAV¹⁴⁸ e cabe salientar que o sítio ativo da NA está situado na região da cabeça desta glicoproteína, consistindo em 8 aminoácidos funcionais (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 e Y406) e 11 aminoácidos estruturais (E119, R156, W178, S179, D / N198, I222, E227, H274, E277, D293 e E425)¹⁴⁹. Mutações pontuais podem surgir no sítio ativo enzimático, embora altamente conservado, tanto de forma espontânea ou como por consequência da pressão seletiva induzida pelos fármacos, o que pode alterar a arquitetura do sítio ativo da proteína e reduzir a ligação aos NAIs, diminuindo, assim, a susceptibilidade dos vírus aos fármacos.

As mutações, em geral, levam a alterações específicas com cada fármaco. Entretanto, devido à estrutura molecular semelhante compartilhada pelos NAIs, a mesma mutação pode trazer efeitos a mais de um NAI¹³⁷. Em relação ao OST, que é o fármaco mais utilizado, as substituições de maior frequência e efeito são: H275Y (substituição do aminoácido histidina pelo tirosina) nos vírus A(H1N1) (sazonal e pandêmico) e as mutações E119V (substituição do aminoácido ácido glutâmico pelo valina) e R292K (substituição do aminoácido arginina pelo lisina) nos vírus A(H3N2)¹³⁸.

Nos vírus A(H1N1), visto que o OST possui uma grande cadeia lateral hidrofóbica, a NA precisa passar por rearranjos para formação de uma bolsa hidrofóbica para acomodar a ligação ao fármaco. Para formar essa bolsa, o aminoácido E276 deve girar e ligar-se ao resíduo R224 (223 na NA de tipo 1)^{150,151}. Quaisquer mutações que afetem esse rearranjo podem reduzir a afinidade de ligação ao OST levando a uma menor eficiência do fármaco. A substituições H275Y (que causa RS de 260–2078 vezes ao OST e de 172–495 vezes ao PER, quando comparada com uma NA sem a mutação)⁸⁶ apresenta a capacidade de inibir a rotação do resíduo E276 e prevenir a formação da bolsa¹⁵² (Figura 1.14). O resíduo I222 (223 na NA do tipo 1) também pode interferir nessa ligação, mutações com I222R (que causa RS de 14–26 vezes ao OST e de 6,2-11 vezes ao ZAN, quando comparada com uma NA sem a mutação)⁸⁶ pode causar seu efeito por meio de choques estéricos. A cadeia lateral estendida de uma arginina chegaria muito perto da fração hidrofóbica

do OST, interrompendo assim sua ligação. Outra mutação neste resíduo, a I222V reduz a hidrofobicidade do sítio ativo do OST, diminuindo assim as interações favoráveis com o fármaco. Entretanto, como o OST provavelmente ainda se liga em sua forma padrão, a mutação I223V causa um efeito menos pronunciado do que o I222R¹⁵³. Além disso, algumas mutações como D199N^{154,155}, G147R⁹⁰, E119A/D/G¹⁵⁶ e S247N¹⁵⁷ não causam efeitos na susceptibilidade do OST quando emergem sozinhas no gene da NA, mas, quando estão associadas com a H275Y é observado um efeito sinérgico na capacidade de RS ao OST.

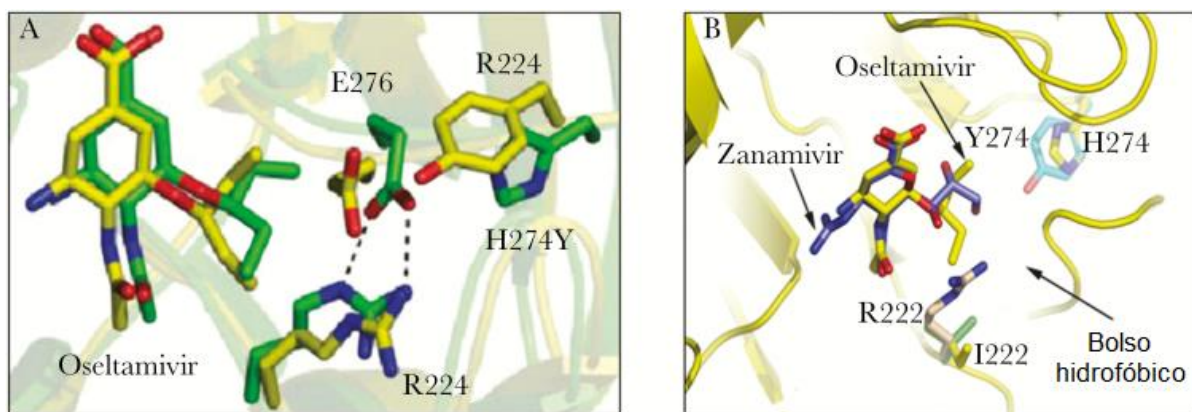


Figura 1.14 - Mecanismo de resistência ao OST mediada por mutações na NA. Modelagem de substituições na NA dos vírus A(H1N1). (A) Sobreposição das estruturas dinâmicas moleculares do OST ligado ao tipo selvagem (verde) e mutante H274Y (amarelo) da N1. O aminoácido E276 da enzima NA deve girar e ligar-se ao resíduo R224 para acomodar a ligação do OST. A mutação H274Y altera esse rearranjo. (B) Representação esquemática do sítio ativo da NA com OST (amarelo) e zanamivir (azul). Pode-se inferir que a mutação I222R provavelmente causará seu efeito por meio de choques estéricos. A cadeia lateral estendida da arginina chegaria muito perto da fração hidrofóbica do OST, interrompendo assim sua ligação. Para o ZAN, no entanto, a fração de glicerol correspondente fica um pouco mais acima no local de ligação e, portanto, será menos interrompida. Adaptado de & Boivin, 2017¹³⁸.

As mutações N295S e Y155H também causam efeito relevantes à sensibilidade do OST quando presentes nos vírus A(H1N1). A substituição N295S, que é a troca do aminoácido (N) pelo aminoácido serina (S), já foi identificada causando RS aos OST e a outros NAIs. Quando presente nos vírus A(H1N1)pdm09, esta mutação já foi detectada causando efeito inibitório de 208 vezes ao OST e de 12 vezes ao PER¹⁵⁸. A mesma também foi identificada em vírus A(H1N1) sazonal, apresentando efeito de 197 de RS ao OST e de 12 vezes ao PER¹⁵⁹. A mutação H155Y é a troca do aminoácido histidina (H) pela tirosina (Y) na posição 155 do gene da NA, e já foi identificada causando relevante RS ao OST (123 vezes) e ao ZAN (555 vezes)¹⁶⁰, mas

esse efeito só foi observado quando presente nos vírus A(H1N1) sazonais que circulavam antes da pandemia de 2009.

Enquanto nos vírus A(H3N2), o motivo da substituição E119V causar a perda de sensibilidade ao OST (212 vezes de RS ao OST quando presente na N2 comparada com uma NA sem a mutação)⁸⁶ é a perda da ponte de hidrogênio entre a cadeia lateral do resíduo 119 da N2 e o grupo amino OST¹³⁸, fato que diminui a ligação com o fármaco. Já a mutação R292K (que causa RS efeito de 7735 vezes de RS ao OST quando presente na N2 comparada com uma NA sem a mutação)⁸⁶, quando presente na N2, não consegue fazer uma ligação de hidrogênio com o resíduo E277, o que leva a formação de uma ponte de sal com resíduo E276, que é orientado em direção ao R224, desta forma, inibindo a rotação de E276, que evita a formação de uma bolsa necessária para acomodar a ligação da OST^{138,150}.

Todavia, algumas mutações, mesmo emergindo em resíduos críticos da NA, não afetam a sua susceptibilidade aos NAIs, como é o caso da H274Y quando emerge no vírus A(H3N2), que possui a NA do tipo 2. Essas duas NA divergem estruturalmente, e a N2 (assim como todas as NA do seu grupo filogenético), possuem mais espaço para a molécula do fármaco se ligar, mesmo com a presença da mutação¹⁶¹.

Adicionalmente, diversas outras mutações associadas a RS aos NAIs já foram detectadas e reportadas tanto nos vírus A(H1N1) quanto nos A(H3N2). No anexo 01 é apresentado um resumo das substituições já detectadas e descritas na literatura até o momento.

No histórico da vigilância de variantes de FluAV com perfil RS aos NAIs, durante o período de 1999 até 2005, a frequência detectada foi baixa (<1%)¹⁶². Porém, esta frequência foi aumentando ao longo dos anos até que, na temporada de 2008-2009, a maior parte da população viral de A(H1N1) sazonal era composta de variantes carregando a substituição H275Y no gene da NA¹⁶³, associada a resistência ao OST¹⁶⁴. Apesar disso, em 2009, o vírus A(H1N1) sazonal foi substituído pela cepa pandêmica A(H1N1)pdm09, que emergiu sem esta substituição, sendo então susceptível ao tratamento com o OST novamente³³.

Atualmente, a frequência de variantes de FluAV resistentes aos NAIs é baixa (<1%)¹⁶⁵. Nos vírus A(H1N1)pdm09, a substituição H275Y, continua sendo observada e descrita como a mais relevante, fornecendo ao vírus altos níveis de RS ao tratamento com OST e/ou PER. Em contrapartida, essa mutação causa diminuição do *fitness* viral¹⁶⁶ e os vírus que a possuem não foram capazes de se espalhar

amplamente. Entretanto, existem indícios de que algumas mutações virais permissivas, que favorecem o *fitness* viral, como V241I e N369K, já estejam incorporadas no genoma dos FluAV atualmente circulantes^{167,168}, fato que possibilita a disseminação na comunidade dos vírus A(H1N1)pdm09, que possuam a substituição H275Y. Ademais, ao longo da última década, foram detectados alguns *clusters* de FluAV com RS aos NAIs, em diversas partes do mundo. Após cada temporada de circulação do vírus, é publicado uma atualização global referente a frequência e perfil dos FluVs circulando na comunidade com marcadores associados a RS aos NAIs, tendo reportado a detecção de variantes nas Américas, Ásia, Europa e Oceania^{47,86,89,165,169}

No Brasil, desde a pandemia de 2009, o monitoramento de cepas com RS aos NAIs vem sendo intensificado. Entretanto, até o momento, somente cepas de A(H1N1)pdm09 foram identificadas, circulando no Brasil, carreando substituições associadas com a RS aos NAIs. Lopes e Souza *et al* descreveu a detecção de 07 cepas abrigando a substituição H275Y e 02 cepas com a substituição S247N entre os anos de 2009 e 2013^{170,171}. Em 2014 foi detectada uma cepa com a substituição I223K¹⁷² e uma com a H275Y¹⁷³. Já em 2015 e 2016, outras 03 cepas apresentando a H275Y foram identificadas¹⁷² (Tabela 1.2). Adicionalmente, foram identificadas cepas de A(H1N1)pdm09 carreando mutações permissivas também durante este período¹⁶⁸. Contudo, de acordo com o último reporte realizado no país, a frequência de detecção de cepas carreando substituições associadas com a RS aos NAIs é baixo (<1%)¹⁷², similar ao identificado nas análises globais⁸⁶.

Tabela 1.2 - Lista de substituições na NA identificadas no Brasil entre 2009 e 2016.

NA – Neuraminidase; UF – Unidade federativa; - RS – Rio Grande do Sul; SC – Santa Catarina; PR – Paraná; MG – Minas Gerais; RJ – Rio de Janeiro; MT – Mato Grosso.

Ano	Substituição na NA	UF	Referência
2009	H275Y	RS	Souza <i>et al.</i> , 2013
2011	S247N	RS	Souza <i>et al.</i> , 2013
2012	H275Y	SC	Souza <i>et al.</i> , 2013
2012	H275Y	PR	Souza <i>et al.</i> , 2013
2012	H275Y	RS	Souza <i>et al.</i> , 2013
2012	H275Y	RS	Souza <i>et al.</i> , 2013
2012	S247N	MG	Souza <i>et al.</i> , 2013
2013	H275Y	RJ	Lopes e Souza <i>et al.</i> , 2015
2013	H275Y	RS	Lopes e Souza <i>et al.</i> , 2015
2014	H275Y	MT	Santos <i>et al.</i> , 2015
2014	I223K	PR	Matos <i>et al.</i> , 2018

2015	H275Y	MG	Matos <i>et al.</i> , 2018
2016	H275Y	RJ	Matos <i>et al.</i> , 2018
2016	H275Y	PR	Matos <i>et al.</i> , 2018

1.1.13 Inibidores de Endonuclease dependente de cap.

A terceira classe farmacológica contra FluV é a dos inibidores de endonuclease dependente de cap, que é a mais recentemente aprovada, possuindo apenas um fármaco licenciado e com uso ainda restrito a poucos países, o baloxavir marboxil (BXM). Os fármacos dessa classe alvejam a subunidade PA do complexo da polimerase viral. Outros fármacos que também alvejam a polimerase são o favipiravir e o pimodivir. O favipiravir alveja a unidade PB1 da polimerase e encontra-se liberado para uso somente no Japão e com uso restrito a FluAV que já sejam resistentes aos demais antivirais. Já o pimodivir alveja a unidade PB2 e ainda se encontra na fase de estudos clínicos¹⁷⁴.

O BXM é um pró-fármaco que é metabolizado em sua forma ativa, o ácido baloxavir (BXA) (Figura 1.15). Vendido com o nome comercial de *Xofluza*, este composto vem ganhando relevância no cenário mundial, tendo sido liberado em 2018 no Japão¹⁷⁵ e EUA¹⁷⁶ e, mais recentemente, no início de 2021, na Europa¹⁷⁷. Porém, até o momento, este fármaco ainda não foi licenciado para uso no Brasil.

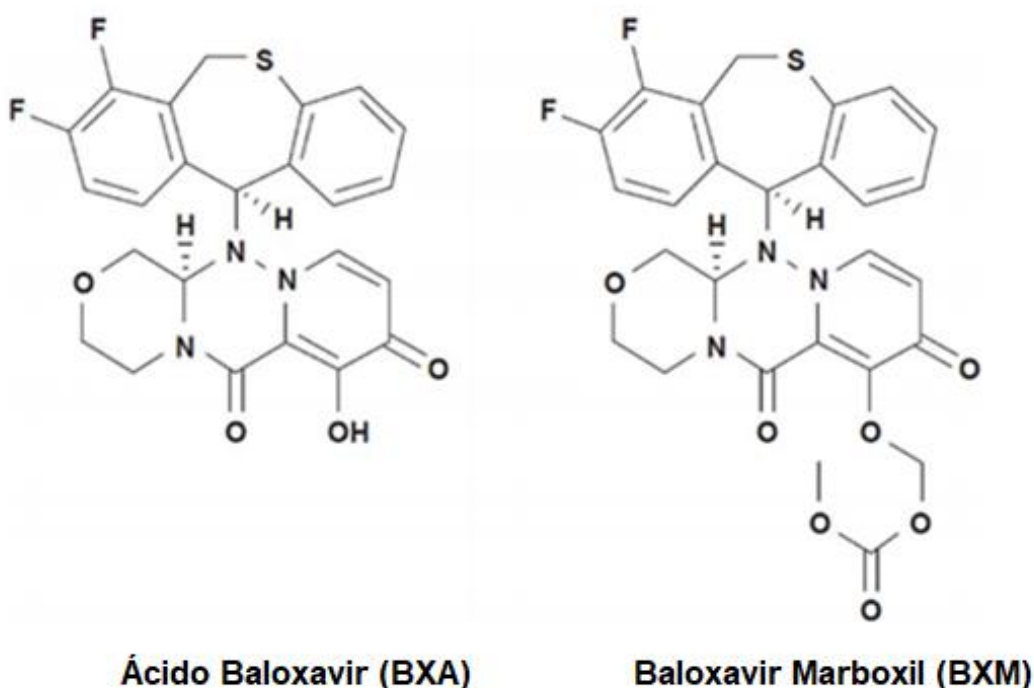


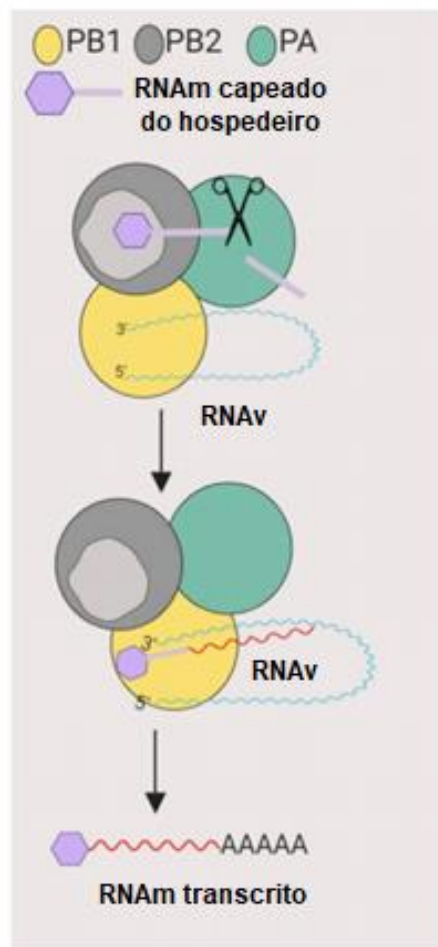
Figura 1.15 - Estrutura molecular dos compostos Ácido baloxavir e Baloxavir marboxil

Fonte: Adaptado de Noshi *et al.*, 2018¹⁷⁸

O BXA teve seu desenho molecular baseado no conceito original do fármaco dolutegravir, um inibidor da proteína integrase do vírus da imunodeficiência humana (HIV)¹⁷⁸. Por inibir a atividade endonuclease dependente de cap realizada pela subunidade PA, interrompe a síntese de RNAm e a replicação viral¹⁷⁵ (Figura 1.16).

A administração do BXM é por via oral, em dose única, sendo utilizado em indivíduos a partir de 12 anos de idade. O uso deste fármaco é recomendado para tratamento de infecções brandas por FluAV e FluBV, podendo também ser administrado junto com o OST¹⁷⁴. O BXM é rapidamente hidrolisado pelas esterases presentes no intestino, fígado e sangue em BXA¹⁷⁹. Em relação a farmacocinética, o BXM apresenta longa presença no plasma, com meia vida de 49-91h¹⁷⁹. O BXM também se apresenta bem tolerado, não tendo efeitos adversos sérios relatados¹⁸⁰.

Atividade endonuclease dependente de cap e transcrição



Mecanismo de ação dos fármacos inibidores de endonuclese dependente de cap

Baloxavir marboxil (BXM)

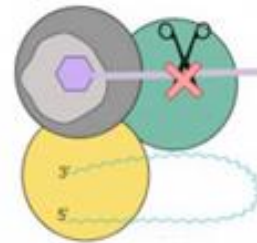


Figura 1.16 - Mecanismo de ação dos inibidores de endonuclese dependentes de cap.

A transcrição do RNAm viral em células infectadas pelo FluV ocorre no núcleo da célula hospedeira. Para realizar este processo, o FluV realiza o processo de *cap-snatching* do RNA do hospedeiro. Para tal, a subunidade PB2 se liga na estrutura *cap* do RNA hospedeiro. Em seguida, os primeiros 10-20 nucleotídeos da fita RNAm são clivados pela proteína PA e usados como um iniciador para a extensão da fita de RNAv realizado pelo PB1. O BXM inibe a atividade endonucleásica PA, impedindo que a mesma clive o RNA hospedeiro, interrompendo assim a síntese de RNAv. Adaptado de Mifsud, Haiden & Hurt, 2019¹⁷⁴.

1.1.14 Resistência aos Inibidores de endonuclese dependente de cap.

Durante os estudos clínicos do BXM de fase II e III, foi identificada a emergência de cepas resistentes ao BXM com frequência de 2,2% na fase II e 9,7% na fase III¹⁸¹. principalmente associadas com presença das substituições I38T/M/F na subunidade PA dos vírus A(H1N1)pdm09, A(H3N2) e FluBV^{178,181}.

A forma ativa BXA forma interações do tipo *Van der Waals* com os resíduos A20, Y24, K34, A37 e I38 da PA do FluAV ou com os resíduos T20, F24, M34, N37 e I38 na PA do FluBV¹⁸². O resíduo PA I38 é altamente conservado entre os FluAV e FluBV. Porém, a mutação I38T, que é a mais frequente a ser detectada na presença do BXA, altera as interações de *Van der Waals* entre a endonuclease viral e o BXA, resultando em redução da estabilidade entre a ligação fármaco-alvo^{182,183}. Em estudos recentes, foram analisadas funcionalmente cepas de A(H3N2) carreando a substituição I38T na PA, as quais apresentaram RS ao BXM de até 48 vezes¹⁷⁶. Adicionalmente, já foram reportadas outras substituições relacionadas com a RS a este fármaco, como a I38L¹⁷⁶ e a E119D¹⁸² no gene da PA viral.

Os estudos de vigilância à cepa resistentes ao BXM realizados no Japão¹⁸⁴, EUA¹⁷⁶ e mais recentemente na Espanha¹⁸⁵ mostram que a frequência de cepas resistentes a este novo fármaco também é baixa (0,08%)⁸⁶. Entretanto, estudos mais amplos precisam ser feitos para determinar a frequência dessas cepas ao redor do mundo.

1.2 Justificativa

Os fármacos antivirais são uma importante ferramenta no manejo dos FluVs. A utilização desses compostos combate a alta carga de morbidade e mortalidade causada por esses vírus, além de serem uma importante estratégia de profilaxia e de controle, especialmente em épocas de surtos ou no caso da emergência de uma nova cepa viral, na qual a produção de uma vacina efetiva pode levar meses.

Uma vez que o tratamento e a profilaxia para as infecções respiratórias causadas por FluV são atualmente realizadas com os fármacos da classe dos NAIs, pois este patógeno encontra-se resistente aos adamantanos, é fundamental o monitoramento do surgimento de cepas resistentes e sua transmissão na comunidade. Para tanto, além do monitoramento na população em geral que procura as unidades de saúde para atendimento, também é importante que grupos de risco, como os grupos dos pacientes imunocomprometidos ou com o agravamento do quadro desta infecção, sejam acompanhados rigorosamente. Estes grupos de pacientes possuem mais risco de surgimento de cepas resistentes ao tratamento, por comprometimento de seu sistema imune no combate à infecção e, conseqüentemente, pelo vírus encontrar um ambiente mais propício para sua replicação, o que tem o potencial de formação de vírus com mutações associadas à

resistência. Além disso, estes grupos também são submetidos a um maior tempo de tratamento com os fármacos antivirais, o que também possui maior potencial de geração de cepas resistentes pelo processo de seleção viral.

Adicionalmente, o presente projeto possui a relevância fundamental de ser o primeiro relato de monitoramento para detecção dos marcadores genéticos associados à RS aos adamantanos e ao BXM no Brasil.

Sendo o LVRS, da Fiocruz, um dos NICs para o Ministério da Saúde e para a WHO, os dados gerados neste projeto também serão utilizados para se traçar o perfil de circulação dos FluAV resistentes a nível nacional. Desta forma, o impacto dos resultados gerados neste projeto vai auxiliar também na orientação das condutas clínicas, tanto na profilaxia quanto no tratamento das infecções causados pelos FluV, como também para políticas públicas de compras e estocagem de medicamentos anti-influenza no Brasil.

Os dados gerados com relação à possível identificação da presença e frequência de cepas resistentes ao tratamento com os antivirais adamantanos, NAIs e BXM, detectados em indivíduos da população brasileira, serão de fundamental impacto na comunidade científica. Os resultados serão comparados e correlacionados com os dados gerados globalmente e esta análise será de grande importância para avaliação do perfil e da frequência destas cepas resistentes no Brasil, comparando-se com o restante do mundo. Estas análises irão continuar a inserção e solidificação dos dados brasileiros no contexto temático mundial acerca deste assunto, especialmente para o novo fármaco BXM, recentemente aprovado em alguns países.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência de FluAV, com redução de susceptibilidade aos antivirais adamantanos, NAIs e BXM, em amostras de casos de infecções respiratórias na população brasileira, no período de 2017-2020.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Avaliar, genotipicamente, por análises moleculares, nas amostras estudadas, através de identificação de marcadores genéticos nos genes da NA, M2 e PA do FluAV associados à redução de susceptibilidade aos antivirais adamantanos, NAIs e BXM.
- ii. Avaliar, fenotipicamente, por análise funcionais, os FluAVs presentes nas amostras estudadas, através da determinação do IC₅₀ dos isolados virais na presença do antiviral OST.
- iii. Avaliar as características clínico-epidemiológicas dos indivíduos que apresentem os marcadores genéticos associados à redução de susceptibilidade aos fármacos, a fim de delinear um perfil da população acometida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O LVRS, por ser um NIC, recebe do sistema de vigilância nacional de influenza amostras representativas da circulação de vírus respiratórios durante todo o ano. Para este estudo foram incluídas amostras provenientes de indivíduos positivos para FluAV, com o agravo tanto na forma branda (SG), quanto na forma grave (SRAG), cujo início tenha sido desencadeado em, no máximo, sete dias antes da coleta do material, de maneira representativa ao período e região. Estes vírus tiveram circulação entre 01/01/2017 a 31/12/2020, e foram oriundos dos seguintes estados da federação: Alagoas (AL), Sergipe (SE) e Bahia (BA), da região nordeste; Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ), da região sudeste; e Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), da região Sul.

A definição de caso de SG é de acordo com a presença de febre de início súbito, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e de, pelo menos, um dos seguintes sintomas: cefaleia, mialgia ou artralgia. Enquanto o caso de SRAG é definido como um caso de SG acompanhado de dispneia ou saturação de oxigênio menor do que 95% em ar ambiente ou sinais de desconforto respiratório, em pacientes hospitalizados.

Além disso, também foram incluídas amostras provenientes de indivíduos recrutados no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer (INCA).



Figura 3.1 - Mapa político do Brasil mostrando os estados de origem das amostras de estudo.

Amarelo - Região Nordeste; Verde - Região Sudeste e Azul – Região Sul.

3.2 Comitê de ética

Este projeto está cadastrado no CEP IOC/Fiocruz sob o número CAAE 68118417.6.0000.5248 e no CEP/INCA sob o número CAAE 68118417.6.3002.5274.

3.3 Coleta e processamento de amostras clínicas

Antes da coleta das amostras clínicas, a equipe da unidade sentinela coletou as informações clínicas e epidemiológicas de cada paciente por meio de entrevistas com eles. As informações foram registradas em formulários clínico-epidemiológicos padronizados da rede de vigilância epidemiológica de influenza, sendo um formulário por paciente. Após o registro dos dados, foi coletada uma amostra combinada de esfregaços de naso e orofaringe. Estas amostras foram obtidas por meio de esfregaços da mucosa com *swabs* de *rayon*, realizados por um profissional de saúde treinado. Para obter a amostra de nasofaringe, o *swab* (um para cada narina) é introduzido na narina até sentir resistência e é, então, friccionado gentilmente contra a parede para provocar leve descamação da superfície. Para obter a amostra de orofaringe, o *swab* é introduzido na boca até alcançar a área posterior da faringe e tonsilas, evitando tocar na língua. Os três *swabs* de um mesmo paciente foram colocados em um único tubo de coleta contendo 3 ml de solução de meio de transporte viral, que consiste em meio essencial de Eagle (*MEM*, *Gibco™*) suplementado com 1% de albumina bovina (*Sigma™*), antibióticos penicilina/estreptomicina (*Gibco™*) e antimicótico anfotericina B (*Gibco™*). As amostras foram alíquotadas e mantidas a -80° C até o momento de sua utilização. O envio das amostras foi realizado sob refrigeração das mesmas pelo LACEN correspondente.

3.4 Detecção e subtipagem molecular de FluAV nas amostras do estudo

O RNA viral foi extraído das amostras combinadas de esfregaço de naso e orofaringe, empregando-se kit comercial (“*High Pure Viral RNA Kit*”, *Roche™*; ou “*QIAamp Viral RNA Kit*”, *Qiagen™*), de acordo com instruções do fabricante. Para

detecção e subtipagem dos vírus, o RNA foi submetido a uma reação do tipo “passo único” (*one step*), em que a transcrição reversa é seguida imediatamente, e no mesmo tubo de reação, pela amplificação do DNAc com oligonucleotídeos e sondas específicos para genes dos vírus A(H1N1)pdm09 e A(H3N2), através de realização de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real), com metodologia preconizada pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (CDC *Influenza Virus Real-time RT-PCR Typing Panel*)¹⁸⁶.

3.5 Sequenciamento genético viral

Foram empregadas três metodologias distintas para realizar o sequenciamento genético: pirosequenciamento, com a finalidade de triagem do marcador H275Y nos vírus A(H1N1)pdm09; e sequenciamento de *Sanger* e *Next Generation sequencing* (NGS) para sequenciamento completos dos genes NA, M e PA.

3.5.1 Pirosequenciamento

As amostras positivas para o vírus A(H1N1)pdm09 foram elegíveis para essa metodologia. Para tal, foi realizada uma reação RT-PCR inicial (Tabela 3.1), utilizando os oligonucleotídeos: *direto* 5'-AGATCGAGAAGGGGAAGGTAACTA-3' e o reverso biotinilado 5'-GTCYCTGCATACACATCACT-3'¹⁸⁷, em uma reação de etapa única com a enzima *OneStep RT-PCR Enzyme Mix (Qiagen™)*. Os produtos da reação de RT-PCR, biotinilados, foram então misturados com estreptavidina (*GE Healthcare™*) e submetidos a uma série de lavagens para se obter um DNA de fita simples biotinilado. Este DNA foi usado como molde para a hibridização com o oligonucleotídeos específicos 5'-AAATGCACCCAAT-3'¹⁸⁷ para sequenciamento dos resíduos avaliados. Os ensaios foram realizados no sistema *PyroMark Q96 ID (Qiagen™)*, no modo SNP. Os resultados foram analisados no software *Pyromark Q96 (Qiagen™)*.

Tabela 3.1 - Ciclagem da reação de RT-PCR pelo alvo NA H275Y

Temperatura/ tempo	Fase	Quantidade de ciclos
50°/ 30min	Transcrição reversa	1 ciclo
95°/ 15min	Desnaturação enzimática	1 ciclo

94°/ 30seg	Desnaturação	
55°/ 15seg	Hibridização	40 ciclos
72°/ 01min	Extensão	
72°/ 10min	Extensão final	1 ciclo

3.5.2 Sequenciamento de Sanger

Esta metodologia foi utilizada para realizar sequenciamento completo do gene da NA de amostras coletadas até 2018. Foram incluídas amostras com os seguintes critérios: carga viral alta (CT>30), gravidade (SRAG ou óbito), uso do antiviral OST e indicação pela triagem prévia com o pirosequenciamento. Para este método, foi realizada a síntese de cDNA (tabela 3.2) com enzima de transcrição reversa (*Superscript III, ThermoFisher™*, ou similar) utilizando os oligonucleotídeos UNI 12 (5'-AGCAAAAGCAGG-3')¹⁸⁸, seguida de amplificação por PCR (tabela 3.3), utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene NA (Tabela 3.4), desenhados e indicados pelo CDC-EUA e enzima polimerase (*Taq platinum, ThermoFisher™*). Em seguida, os fragmentos amplificados foram purificados com *kit* de enzimas (*Exosap-it, ThermoFisher™*) (Tabela 3.5) e então realizado a reação de sequenciamento, utilizando *kit* (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1, ThermoFisher™*) (tabela 3.6). Todas as reações descritas acima foram realizadas no termociclador (*Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems™*). Os produtos foram analisados no *ABI Prism 3130XL genetic analyser™* (*Life technologies™*). O conjunto de dados foi organizado no *software Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation™)*, utilizando uma sequência de referência de NA do vírus em questão. Por fim, as sequências geradas foram depositadas no banco de dados público *Global Initiative on Sharing Influenza Data (GISAID)*.

Tabela 3.2 - Ciclagem da reação de síntese de cDNA

Temperatura/ tempo	Fase
50°/ 90min	Transcrição reversa
95°/ 15min	Desnaturação enzimática

Tabela 3.3 - Ciclagem da reação de PCR para amplificação do gene NA

Temperatura/ tempo	Fase	Quantidade de ciclos
95°/ 02min	Desnaturação enzimática	1 ciclo
95°/ 30seg	Desnaturação	35 ciclos
55°/ 30seg	Hibridização	
72°/ 01min	Extensão	
72°/ 05min	Extensão final	1 ciclo

Tabela 3.4 - Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento completo do gene NA, pela metodologia de Sanger.

Adaptado de WHO, 2018¹⁸⁹

Vírus	Oligo	Sequência 5' - 3'
A(H1N1)pdm09	CSW F1	AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATG
	CSW F1440	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTTGA
	A N1pdmNA F1 0	TGTAAAACGACGGCCAGTAGCAAAAGCAGGAGT
	A N1pdmNA R1 661	CAGGAAACAGCTATGACCTCTGTTATTATRCRRTTGTA
	A N1pdmNA F2 365	TGTAAAACGACGGCCAGTTGTCATRAGRGARCCATTCA
	A N1pdmNA R2 865	CAGGAAACAGCTATGACCTAACAGGAGCATTCCCTCATA
	A N1pdmNA F3 525	TGTAAAACGACGGCCAGTCCATACTCAAGATTTGAGTCAG
	A N1pdmNA R3 1210	CAGGAAACAGCTATGACCCGCTATATCCTGACCACTCATT
	A N1pdmNA F4 762	TGTAAAACGACGGCCAGTAATGGRCARGCCTCRTACAA
	A N1pdmNA R4 1346	CAGGAAACAGCTATGACCGCTGCTYCCRCCTAGTCCAGAT
	A N1pdmNA F5 1080	TGTAAAACGACGGCCAGTGGCAATGGTGTGGATAGG
	A N1pdmNA R5 1464	CAGGAAACAGCTATGACCCTATGACCAGTAGAAACAAGGAGTTT
	M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	
A(H3N2)	A N2 NA F1 0	TGTAAAACGACGGCCAGTAGCAAAAGCAGGAGT
	A N2 NA R1 604	CAGGAAACAGCTATGACCCTCCCATRTRAAATGAAGCTRGCAGT
	A N2 NA F2 156	TGTAAAACGACGGCCAGTGTGTGAACCAAYAATAATAGAA
	A N2 NA R2 783	CAGGAAACAGCTATGACCGACARYGTGCTYAGTATGAACGATT
	A N2 NA F3 552	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTTCMAGYTCAAGTTGTCA
	A N2 NA R3 977	CAGGAAACAGCTATGACCGTGTGTCTCCAACAAGYCC
	A N2 NA F4 723	TGTAAAACGACGGCCAGTGAACCTTGTRCAGTRGTAATG
	A N2 NA R4 1278	CAGGAAACAGCTATGACCCTCCACATAAAAARCAAC
	A N2 NA F5 888	TGTAAAACGACGGCCAGTCAAYTGGARAGGCTCCAATAG
	A N2 NA R5 1452	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAGAAACAAGGAG

Tabela 3.5 - Reação de purificação dos fragmentos de NA para sequenciamento

Temperatura/ tempo	Fase
37°/ 15min	1ª Incubação
80°/ 15min	2ª Incubação

Tabela 3.6 - Ciclagem da reação de sequenciamento do gene da NA

Temperatura/ tempo	Fase	Quantidade de ciclos
96°/ 10seg	Desnaturação	
50°/ 05seg	Hibridização	35 ciclos
60°/ 04min	Extensão	

3.5.3 Sequenciamento de nova geração (NGS)

Até o ano de 2019, as sequências dos genes NA, M2 e PA de amostras de FluAV foram geradas através do sequenciamento completo do genoma do vírus, pela metodologia NGS, utilizando a plataforma *Illumina™*, realizado pelos centros colaboradores de *Atlanta*, EUA (CDC) e *Melbourne*, Australia. A partir do ano de 2019 essa metodologia foi realizada pela equipe responsável no LVRS, seguindo os mesmos critérios de inclusão do sequenciamento de *Sanger*. Para este sequenciamento, foi realizada síntese do DNAc, por transcrição reversa múltipla (MRT-PCR). Em seguida, foram geradas as bibliotecas de DNA, utilizando o *kit* de preparação de amostras *Nextera XT DNA (Illumina™)*. A distribuição do tamanho das bibliotecas foi avaliada usando um *Bioanalyzer 2100 (Agilent™)* e a quantificação de DNA foi obtida usando o equipamento de PCR em tempo real *7500 (Applied Biosystems™)* e os *kits* de quantificação da biblioteca KAPA (*Kapa Biosystems™*). O sequenciamento de extremidade pareada (2 x 150 pb) foi realizado em um *MiSeq (Illumina™)*. Os dados gerados foram processados pelo software IRMA (*iterative refinement meta-assembler™*). Em seguida, as sequências geradas foram depositadas no banco de dados públicos GISAID.

3.6 Análise de sequências depositadas em bancos de dados públicos

Sequências genéticas de FluAV circulantes no Brasil, oriundas da rede de vigilância de influenza foram obtidas no banco de dados públicos GISAID (disponível em <https://www.gisaid.org/>). Para tal, foram utilizados os seguintes critérios de busca: FluAV, hospedeiro humano, localização: América do Sul/ Brasil, coleta entre 1 janeiro de 2017 e 31 de dezembro de 2020, contendo ao menos um dos seguintes segmentos

gênicos: NA, MP e PA. Em seguida, tais sequências foram analisadas quanto a presença de mutações associadas a RS aos antivirais, com a ferramenta *FLUSERVER* (disponível em <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/fluserver-app/>).

3.7 Cultura de células e isolamento viral

Esta metodologia foi realizada pela equipe responsável no LVRS. Para cultura celular e isolamento viral, foram utilizadas células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) cultivadas em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100µL/mL penicilina/estreptomicina (Gibco™) e incubadas a 37°C com 5% CO₂. Em seguida, foi realizado o isolamento viral nestas células em monocamada e confluentes, na presença de 2 µg/mL de tripsina-TPCK (do inglês, *tosyl phenylalanylchloromethyl ketone*) (*ThermoFisher™*), por uma hora. Após a retirada do inóculo viral, as células foram mantidas em cultura até a visualização de efeito citopático¹⁹⁰. Após, o sobrenadante celular foi recolhido e congelado para as análises de titulação viral, através de titulação por contagem de unidades formadoras de placa (PFU), por detecção do RNA viral ou atividade da NA.

3.8 Ensaios funcionais de sensibilidade dos isolados de FluAV ao NAI OST.

Para esta análise, utilizando o kit comercial *NA-STAR* (*ThermoFisher™*), seguindo as orientações do fabricante¹⁹¹, os isolados virais foram titulados quanto a atividade da NA, em RLU (unidade relativa de luminescência). Sendo excluídos os isolados com atividade menor do que 10000 RLU. Os isolados com atividade entre 10000 e 30000 RLU, seguiram para a próxima análise. Em seguida, foi realizada a determinação do IC₅₀ (concentração de fármaco para inibição de 50% da atividade da NA) dos isolados virais, através de testes em concentrações crescentes do fármaco OST e medindo-se a atividade da NA utilizando novamente o kit comercial *NA-STAR* (*ThermoFisher™*). A classificação do perfil de susceptibilidade dos isolados foi realizada de acordo com os critérios da WHO para os valores de IC₅₀ do OST de cada isolado e tendo como base comparativa a mediana anual de IC₅₀ dos vírus testados¹⁹² (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Critérios para avaliação fenotípica dos FluAVs ao NAIs
FluAV – Vírus influenza A.

Vírus	IC₅₀ (µM)	Perfil
FluAV	Até 10 vezes o valor da mediana do ano	Susceptibilidade Normal (SN)
	De 10 a 100 vezes o valor da mediana do ano	Redução de susceptibilidade (RS)
	Maior do que 100 vezes o valor da mediana	Alta redução de susceptibilidade (ARS)

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da população de estudo.

Durante o período de estudo, o LVRS recebeu 2068 amostras de secreções respiratórias positivas para FluAV, das quais 1020 (49,3%) foram incluídas nesse estudo, conforme a disponibilidade dos recursos e perfil de gravidade dos casos e representação do período e regiões. Destas, 182 amostras (17,8%) foram coletadas em 2017, 424 (41,6%) em 2018, 341 (33,4%) em 2019 e 73 (7,2%) em 2020 (Tabela 4.1). Quanto ao perfil virológico, 699 (68,5%) das amostras foram identificadas como A(H1N1)pdm09 e 321 (31,5%) como A(H3N2) (Tabela 4.1).

Avaliando o perfil epidemiológico das amostras estudadas, 538 (52,7%) das mesmas foram provenientes de indivíduos do sexo feminino e 482 (47,3%) de indivíduos do sexo masculino. Os pacientes infectados apresentaram mediana de idade de 36 anos (com variação de um paciente recém-nascido com 7 dias de idade a um idoso com 99 anos) (Tabela 4.1). Sobre a origem geográfica das amostras, a maior parte (47,9%) é oriunda da região sul do país, seguida pela região sudeste (36,1%) e, por último, a região nordeste (16,0%) (Tabela 4.1). Quanto à sazonalidade, a maior parte das amostras foi coletada durante os períodos mais frios do ano, com 46,7% e 34,0% das amostras coletadas durante o outono e o inverno, respectivamente, e 11,1% e 8,2% coletadas durante verão e primavera (Tabela 4.1).

Com relação ao perfil clínico dos pacientes cujas amostras foram incluídas no estudo, 39,3% foram classificados como SRAG e 11,4% evoluíram para óbito. Em relação ao tratamento, 32,3% dos pacientes foram tratados com OST (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Perfil virológico, epidemiológico e clínico das amostras incluídas no estudo, por ano.

SRAG – Síndrome respiratória aguda grave. OST – Oseltamivir.

	2017	2018	2019	2020	Total (%)
Amostras (n)	182	424	341	73	1020 (100%)
Perfil virológico					
A(H1N1)pdm09 (n)	15	353	273	58	699 (68,5%)
A(H3N2) (n)	167	71	68	15	321 (31,5%)
Perfil epidemiológico					
Sexo feminino (n)	105	215	181	37	538 (52,7%)
Sexo masculino (n)	77	209	160	36	482 (47,3%)

Mediana de Idade (anos)	36 anos (com variação de um paciente recém-nascido com 7 dias de idade a um idoso com 99 anos)				
Região de origem					
Norte (n)	24	95	38	6	163 (16,0%)
Sudeste (n)	64	156	121	27	368 (36,1%)
Sul (n)	94	173	182	40	489 (47,9%)
Sazonalidade					
Primavera (n)	8	22	54	0	84 (8,2%)
Verão (n)	22	28	23	40	113 (11,1%)
Outono (n)	88	180	175	33	476 (46,7%)
Inverno (n)	64	194	89	0	347 (34,0%)
Perfil clínico					
SRAG (n)	61	195	126	19	401 (39,3%)
Óbitos (n)	16	44	55	1	116 (11,4%)
Uso do OST (n)	41	149	131	8	329 (32,3%)

4.2 Detecção de marcadores genéticos associados com RS ao antivirais.

Para a detecção de substituições associadas com a RS aos antivirais, inicialmente, foi realizada uma triagem molecular pelo mais relevante marcador associado RS ao OST, a substituição NA H275Y, nas amostras de A(H1N1)pdm09. Este ensaio foi completado com sucesso em 461 amostras de A(H1N1)pdm09 (66,0% do total), sendo 15 amostras de 2017, 261 amostras de 2018, 160 amostras de 2019 e 25 amostras de 2020 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Triagem molecular, pelo alvo H275Y, de amostras de A(H1N1)pdm09, por ano.

Triagem molecular, realizado por pirosequenciamento, em amostras de A(H1N1)pdm09 de todo o período.

Ano	Amostras	H275Y
2017	15	0
2018	261	0
2019	160	1
2020	25	0
Total	461	1

Dessa forma, foi detectada uma amostra carregando o marcador H275Y (A/Espírito Santo/974/2019), a qual apresentou substituição do nucleotídeo guanina (G) pelo nucleotídeo Adenina (A), na posição de interesse, indicando a presença da mutação H275Y em 100% das populações virais da amostra (Figura 4.1). Esta amostra, A/Espírito Santo/974/2019, foi coletada em um caso do sexo masculino, de 41 anos, residente no estado do ES. O paciente apresentou o início dos sintomas no dia 04/09/2019 e, no mesmo dia, foi efetuada a coleta da amostra e início do tratamento com o fármaco OST (Tabela 4.4). Em seguida, com o intuito de verificar a disseminação de variantes de A(H1N1)pdm09 carregando a substituição H275Y, na região na qual foi detectada a amostra A/Espírito Santo/974/2019, foi realizada a triagem molecular em outras 18 amostras (Tabela 4.2) do estado do ES que circularam entre os meses de agosto e outubro de 2019. Entretanto não foi detectada nenhuma amostra adicional apresentando a substituição H275Y no gene da NA.

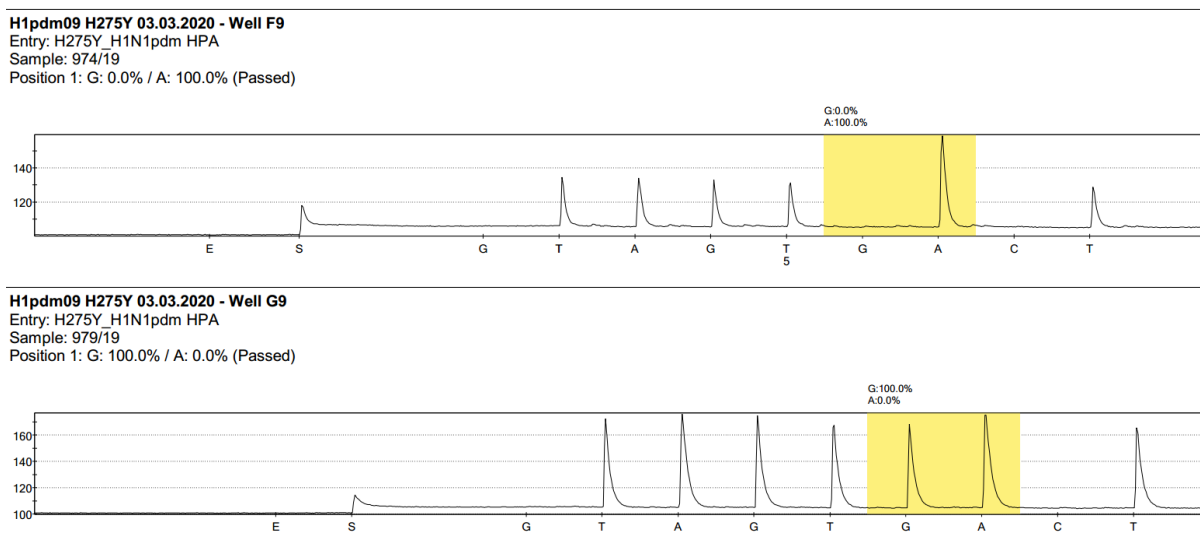


Figura 4.1 - Pirograma para triagem da substituição H275Y na NA viral

A) Resultado de análises por pirosequenciamento da amostra A/Espírito Santo/974/2019, apresentando a substituição do nucleotídeo G por A, quantificado em 100% dos seus resíduos na posição de interesse. B) Pirograma representativo de amostra de A(H1N1)pdm09, apresentando o nucleotídeo G selvagem na posição de interesse em 100% dos resíduos analisados. E – enzima; S – substrato; A – adenina; T – timina; C – citosina; G – guanina.

Em seguida, para a realização de um rastreamento mais amplo de mutações associadas com a RS aos antivirais nos FluAVs, os genes da NA, M2 e PA foram sequenciados, por completo. No total, o gene completo da NA foi analisado em 390 amostras, provenientes de 2017 a 2020, das quais 198 foram do subtipo A(H1N1)pdm09 e 192 foram do subtipo A(H3N2) (Tabela 4.3). Em relação ao gene

M2, foram analisadas 209 amostras, sendo 99 do subtipo A(H1N1)pdm09 e 110 de A(H3N2) (Tabela 4.3). Ademais, para o gene PA, entre 2017 e 2020, 191 amostras de FluAV foram sequenciadas, das quais 62 foram de A(H1N1)pdm09 e 27 de A(H3N2) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Amostras de FluAVs com os genes NA, M2 e PA sequenciados, distribuídas de acordo com ano de coleta e subtipo

NA – Neuraminidase. M2 – Matriz 2. PA – Polimerase ácida. FluAV – Vírus Influenza A.

	2017	2018	2019	2020	Total
Gene NA					
A(H1N1)pdm09 (n)	5	52	95	46	198
A(H3N2) (n)	102	21	54	15	192
Gene M2					
A(H1N1)pdm09 (n)	5	41	41	12	99
A(H3N2) (n)	45	19	31	15	110
Gene PA					
A(H1N1)pdm09 (n)	5	37	38	12	92
A(H3N2) (n)	44	17	23	15	99

Dando continuidade as análises sobre o gene NA, das 390 amostras de FluAV (Tabela 4.3) que tiveram o gene NA sequenciado com sucesso, foram detectadas algumas substituições associadas com a RS aos NAIs. Em amostras do subtipo A(H3N2), foram identificadas as substituições I222V (n=6), V149A (n=3), N329K (n=1), Q136K (n=1), Y155H (n=1) e V149A/Y155H (N=4). Além dessas, a amostra de A(H1N1)pdm09, A/Espirito Santo/974/2019, que foi detectada com o marcador H275Y pela triagem por pirosequenciamento, também teve o gene da NA completamente sequenciado e essa alteração foi confirmada. Os resultados obtidos foram resumidos e apresentados na Tabela 4.4 e um esquema, quanto a origem geográfica de cada ano está presente no Anexo 02.

Tabela 4.4 - Dados clínico-epidemiológicos das amostras carreando substituições associadas com RS aos NAIs

NA – Neuraminidase. UF – Unidade federativa. SRAG - Síndrome respiratória aguda grave. OST – Oseltamivir. N.D – N.I – Não informado. M – Masculino. F – Feminino. PR – Paraná. SC – Santa Catarina. ES – Espírito Santo. RGS – Rio Grande do Sul. RJ – Rio de Janeiro. BA – Bahia.

Vírus	Amostra	Substituição na NA	UF	Sexo	Idade (anos)	SRAG	Data de início dos sintomas	Data da Coleta	Data de Início do tratamento com OST
A(H3N2)	A/Parana/99/2017	I222V	PR	M	42	Não	13/02/2017	16/02/2017	Sem uso
A(H3N2)	A/Santa Catarina/142/2017	V149A	SC	M	71	Não	22/03/2017	24/03/2017	Sem uso
A(H3N2)	A/Parana/152/2017	I222V	PR	M	86	N I	03/03/2017	07/03/2017	07/03/2017
A(H3N2)	A/Espírito Santo/174/2017	N329K	ES	M	34	Não	07/03/2017	10/03/2017	10/03/2017
A(H3N2)	A/Parana/235/2017	I222V	PR	M	50	SRAG	13/04/2017	14/04/2017	14/04/2017
A(H3N2)	A/Rio Grande do Sul/287/2017	V149A	RS	M	20	Não	10/05/2017	11/05/2017	Sem uso
A(H3N2)	A/Parana/340/2017	I222V	PR	M	08	SRAG	01/05/2017	12/05/2017	11/05/2017
A(H3N2)	A/Brazil/399/2017	I222V	SC	M	28	SRAG	14/05/2017	21/05/2017	N I
A(H3N2)	A/Parana/490/2017	I222V	PR	F	15	Não	25/06/2017	26/06/2017	N I
A(H3N2)	A/Santa Catarina/918/2017	Y155H/V149A	SC	M	26	N I	14/10/2017	16/10/2017	16/10/2017
A(H3N2)	A/Rio de Janeiro/78/2018	Y155H/V149A	RJ	M	35	N I	26/01/2018	29/01/2018	N I
A(H3N2)	A/Santa Catarina/1182/2018	Y155H/V149A	SC	M	22	Não	29/08/2018	01/09/2018	N I
A(H3N2)	A/Bahia/339/2019	Y155H/V149A	BA	F	93	SRAG	05/05/2019	11/05/2019	08/05/2019
A(H3N2)	A/Espírito Santo/503/2019	V149A	ES	F	74	SRAG	06/06/2019	10/06/2019	N I
A(H1N1)pdm09	A/Espírito Santo/974/2019	H275Y	ES	M	41	Não	04/09/2019	04/09/2019	04/09/2019
A(H3N2)	A/Rio Grande do Sul/1035/2019	Q136K	RS	M	52	Não	07/08/2019	09/08/2019	N I
A(H3N2)	A/Rio Grande do Sul/212/2020	Y155H	RS	M	32	Não	23/02/2020	27/02/2020	N I

O próximo gene analisado foi o M2. Esse gene é oriundo do gene MP, que dá origem ao gene M1 e, por *splicing* alternativo, forma o M2, que é o gene que codifica a proteína do canal iônico M2, alvo dos fármacos adamantanos. Durante o período de estudo, 209 amostras de FluAV tiveram o gene M2 sequenciado (Tabela 4.3). Das amostras analisadas, 208 apresentaram o marcador S31N, que confere resistência contra os fármacos adamantanos, porém a amostra A/Brazil/358/2017, pertencente ao subtipo A(H3N2), não apresentava nenhum marcador de resistência, sendo detectada com o aminoácido N na posição 31 do gene M2. Esta amostra foi recuperada de uma paciente do sexo feminino, com 82 anos, residente do estado do ES, sendo coletada em 07/05/2017 (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Amostra de A(H3N2) sem marcadores de resistência aos fármacos adamantanos.

ID – Identificação. UF – Unidade federativa. ES – Espírito Santo. F – Feminino. Fonte: Sousa, TC. 2021

Vírus	Amostra	Substituição no M2	UF	Sexo	Idade (Anos)	Data da Coleta
A(H3N2)	A/Brazil/358/2017	N31	ES	F	82	07/05/2017

O último gene analisado foi o PA, que codifica a subunidade PA do complexo polimerase dos FluAVs, proteína alvo do fármaco inibidor de endonuclease dependente de cap, BXM. Durante o período de estudo, 191 amostras de FluAV (Tabela 4.3) foram tiveram este gene analisado, o que levou à detecção de uma amostra carregando a substituição E199D, associada com a RS ao BXM. Esta amostra, do subtipo A(H3N2), identificada como, A/Brazil/339/2017, foi obtida através de coleta no dia 02/05/2017, oriunda de um paciente, do sexo masculino, com 21 anos, residente do estado do PR (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Amostra carregando marcador associado com RS aos inibidores de endonuclease dependente de cap.

ID – Identificação. PA – Polimerase ácida. UF – Unidade federativa. PR – Paraná. M -Masculino. Fonte: Sousa, TC. 2021

Vírus	Amostra	Substituição na PA	UF	Sexo	Idade (Anos)	Data da Coleta
A(H3N2)	A/Brazil/339/2017	E199D	PR	M	21	02/05/2017

Adicionalmente, com o intuito de ampliar a vigilância sobre possíveis cepas mutantes que podem se disseminar pelo país, sequências genéticas de FluAV, circulantes durante o período de estudo nas outras regiões do Brasil não abrangidas pelo NIC Fiocruz, foram obtidas através do banco de dados online GISAID.

No período do estudo, 407 sequências de FluAV, com os critérios desejados, foram depositadas no GISAID. Após a retirada das sequências duplicadas, restaram 323 sequências, sendo 101 do ano de 2017, 125 de 2018, 85 de 2019 e 12 de 2020. Em relação aos genes, 323 depósitos continham o gene NA, 248 o gene M2 e 245 o gene PA (Tabela 4.7)

Tabela 4.7 - Número de sequências genéticas de FluAV circulantes no Brasil, de regiões fora da abrangência do NIC Fiocruz, depositadas no GISAID, de acordo com os genes de interesse aos antivirais, por ano e subtipo.

NA - Neuraminidase. M2 -Matrix 2. PA - Polimerase ácida. Fonte: Sousa, TC. 2021

	2017	2018	2019	2020	Total
Total de sequências	101	125	85	12	323
Gene NA					
A(H1N1)pdm09 (n)	3	71	49	12	135
A(H3N2) (n)	98	54	34	0	186
Gene M2					
A(H1N1)pdm09 (n)	3	65	37	12	117
A(H3N2) (n)	52	49	30	0	131
Gene PA					
A(H1N1)pdm09 (n)	3	63	38	12	116
A(H3N2) (n)	52	48	29	0	129

Com relação ao gene da NA, das 323 sequências disponíveis no GISAID, 135 eram de A(H1N1)pdm09 e 186 de A(H3N2) (Tabela 4.7). Após a análise, foram detectadas 22 sequências contendo substituições associadas com RS aos NAIs, em 2 amostras de A(H1N1)pdm09 e 20 de A(H3N2). No subtipo A(H1N1)pdm09, foram identificadas duas amostras que circularam em 2018. A amostra A/Brazil/4449/2018 foi identificada carregando a mutação Y155H, porém não havia informações sobre sua origem geográfica. A segunda sequência, A/Ceara/152545-IEC/2018, possuía a substituição S247N, sendo proveniente do estado do Ceará (CE) (Tabela 4.8). Quanto ao subtipo A(H3N2), 20 amostras apresentaram alterações associadas à RS aos NAIs (Y155H e V149A isoladamente ou em conjunto), sendo procedentes dos seguintes estados: Pará (PA), Pernambuco (PE), São Paulo (SP), Amapá (AP) e PE (Tabela 4.8) (Anexo 02).

Tabela 4.8 - Sequências genéticas de outras regiões brasileiras, carregando marcadores associadas a RS aos NAIs.

NI – Não informado. UF – Unidade Federal. CE – Ceará. AP – Amapá. PE - Pernambuco. SP – São Paulo. PA – Pará. Fonte: Sousa, TC. 2021

Ano	Amostra	ID GISAID	Substituição na NA	UF
A(H1N1)pdm09				
2018	A/Brazil/4449/2018	EPI_ISL_330419	Y155H	NI
2018	A/Ceara/152545-IEC/2018	EPI_ISL_320232	S247N	CE
A(H3N2)				
2017	A/Amapa/146721-IEC/2017	EPI_ISL_275335	V149A	AP
2017	A/Brazil/0485/2017	EPI_ISL_303219	V149A + Y155H	NI
2017	A/Brazil/8711/2017	EPI_ISL_303215	Y155H	NI
2017	A/Pernambuco/146138-IEC/2017	EPI_ISL_275372	V149A	PE
2018	A/Brazil/0593/2018	EPI_ISL_321930	V149A + Y155H	NI

2018	A/Brazil/0750/2018	EPI_ISL_316769	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/3864/2018	EPI_ISL_316435	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/4623/2018	EPI_ISL_329859	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/4827/2018	EPI_ISL_330283	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/6279/2018	EPI_ISL_329835	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/7180/2018	EPI_ISL_330276	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/7331/2018	EPI_ISL_330288	V149A + Y155H	NI
2018	A/Brazil/8178/2018	EPI_ISL_330269	Y155H	NI
2018	A/Brazil/8306/2018	EPI_ISL_329861	V149A + Y155H	NI
2018	A/Pernambuco/151608-IEC/2018	EPI_ISL_329823	V149A + Y155H	PE
2019	A/Campinas/1165167-IAL/2019	EPI_ISL_392544	V149A + Y155H	SP
2019	A/Para/159307-IEC/2019	EPI_ISL_410134	V149A + Y155H	PA
2019	A/Sao_Miguel_Arcanjo/856758-IAL/2019	EPI_ISL_392540	V149A + Y155H	SP
2019	A/Sao_Paulo/1140710-IAL/2019	EPI_ISL_393605	V149A + Y155H	SP
2019	A/Sao_Paulo/1198850-IAL/2019	EPI_ISL_392527	V149A + Y155H	SP

Dando continuidade às análises das sequências genéticas de outras regiões brasileiras depositadas no GISAID, o segundo gene estudado foi o M2. Durante o período de estudo, um total de 248 sequências deste gene, de FluAV, foram depositadas no GISAID. Destas, 117 eram do subtipo A(H1N1)pdm09 e 131 do subtipo A(H3N2) (Tabela 4.7). Entretanto, em todas as sequências analisadas, foi observada a presença do marcador S31N que confere resistência aos fármacos adamantanos.

Por fim, foram analisadas as 245 sequências do gene PA das amostras brasileiras do GISAID, sendo 116 sequências de A(H1N1)pdm09 e 129 do subtipo A(H3N2) (Tabela 4.7). Após a análise, não foi detectada nenhuma sequência genética de FluAV carregando alguma mutação associada com RS ao BMX.

4.3 Análise da sensibilidade dos FluAV circulantes no Brasil, ao fármaco NAI OST.

Com o objetivo de avaliar funcionalmente os isolados brasileiros de FluAV ao OST, pois este ensaio é o padrão ouro para determinar a RS ao fármaco foram analisados 314 isolados, sendo 231 (73,6%) do subtipo A(H1N1)pdm09 e 83 (26,4%) do subtipo A(H3N2) (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 - Número de isolados de FluAV durante o período de estudo, de acordo com subtipo e ano de circulação.

Fonte: Sousa, TC. 2021

	2017	2018	2019	2020	Total
A(H1N1)pdm09 (n)	6	94	122	9	231
A(H3N2) (n)	24	45	14	0	83
Total (n)	30	139	136	9	314

Em relação aos isolados do subtipo A(H1N1)pdm09, no ano de 2017, 6 isolados foram analisados, obtendo-se valores de IC₅₀ ao OST que variaram entre 0,02-0,35 nM (mediana de 0,13nM). No ano seguinte, foram isoladas 94 amostras, que apresentaram IC₅₀ ao OST com variação 0,01-1,89 nM (mediana de 0,35 nM). Já em 2019, 122 isolados foram analisados, com IC₅₀ ao OST variando de 0,01-0,58 nM (mediana de 0,11 nM). Por fim, em 2020, foram analisados 9 FluAVs, obtendo-se IC₅₀ ao OST com variação de 0,04-0,4 nM (mediana de 0,18 nM). No período do estudo, o IC₅₀ ao OST apresentou variação de 0,01-1,89 nM (mediana de 0,17 nM) (Tabela 4.10 e Figura 4.2). De acordo com os critérios de classificação de amostras com RS da WHO (Figura 3.2), todos os isolados foram classificados com o perfil normal de susceptibilidade ao OST. Cabe ressaltar que a amostra de A(H1N1)pdm09 contendo o marcador H275Y na NA (A/Espirito Santo/974/2019) não foi possível de ser isolada.

Tabela 4.10 - Número de isolados de A(H1N1)pdm09 e a mediana correspondente de cada ano incluídos no estudo.

Fonte: Sousa, TC. 2021

	A(H1N1)pdm09				
	2017	2018	2019	2020	Total
Isolados (n)	06	94	122	09	231
Mediana (nM)	0,13	0,35	0,11	0,18	0,17

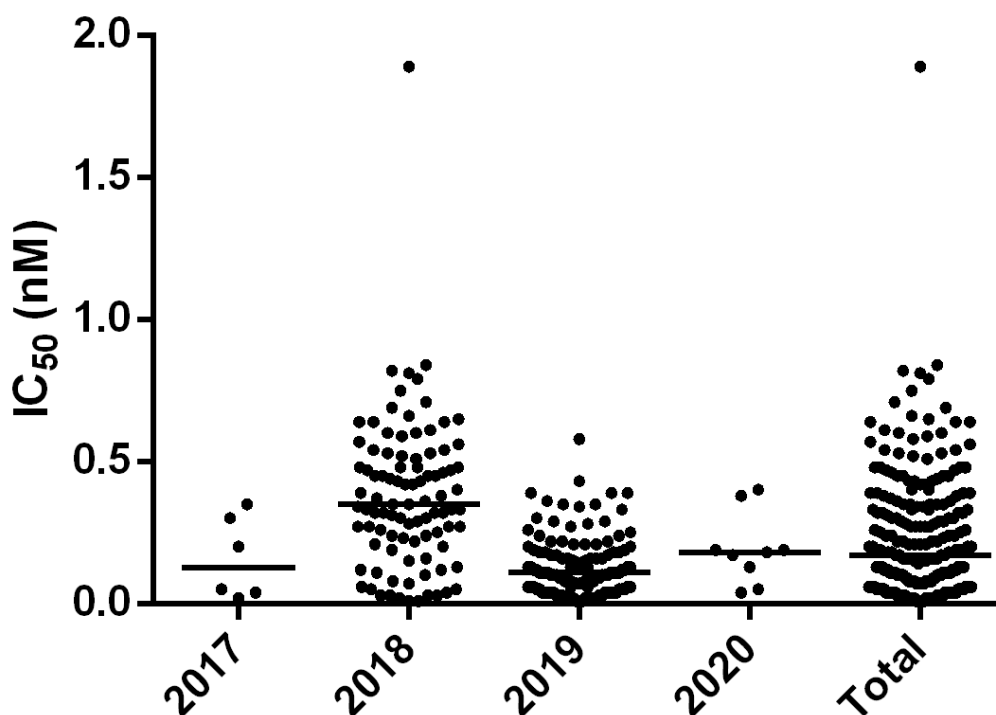


Figura 4.2 - Valores de IC₅₀ do fármaco OST para isolados brasileiros do vírus A(H1N1)pdm09, do período do estudo.

Os isolados foram titulados e os seus valores de IC₅₀ ao OST (nM) foram determinados utilizando o ensaio NA-Star™. Cada ponto representa o valor de IC₅₀ para cada isolado e a mediana de cada ano é representada pela linha preta. Fonte: Sousa, TC. 2021

Concomitantemente, foram realizadas as análises com os isolados de A(H3N2). No primeiro ano de estudo, em 2017, foram isolados 23 vírus, que apresentaram IC₅₀ ao OST variando de 0,10-1,39 nM (mediana de 0,27 nM). Em 2018, 45 isolados de A(H3N2) foram estudados, com IC₅₀ ao OST variando de 0,04-1,76 nM (mediana de 0,29 nM). Em 2019, 14 isolados de A(H3N2) foram avaliados, apresentando valores de IC₅₀ ao OST variando de 0,05-0,34 nM (mediana de 0,13 nM). Em 2020, não foi possível isolar nenhum vírus A(H3N2). No período do estudo, o IC₅₀ ao OST apresentou variação de 0,04-1,76 nM (mediana de 0,22 nM) (Tabela 4.11 e Figura 4.3). De acordo com os critérios de classificação de amostras com RS da WHO (Figura 3.2), todos os isolados foram classificados com o perfil normal de susceptibilidade ao OST. Cabe salientar que, dentre as amostras de A(H3N2) identificadas carreando substituições na NA associadas com RS aos NAIs, 4 foram isoladas, apresentando as alterações Y155H e V149A (A/Santa Catarina/918/2017, A/Rio de Janeiro/78/2018, A/Santa Catarina/1182/2018 e A/Bahia/339/2019), as quais

apresentaram IC₅₀ ao OST de 0,14, 0,10, 0,68 e 0,05 nM, respectivamente (Figura 4.3).

Tabela 4.11 - Número de isolados de A(H3N2) e a mediana correspondente de cada ano incluídos no estudo.

Fonte: Sousa, TC. 2021

A(H3N2)				
	2017	2018	2019	Total
Isolados (n)	24	45	14	83
Mediana (nM)	0,27	0,29	0,13	0,22

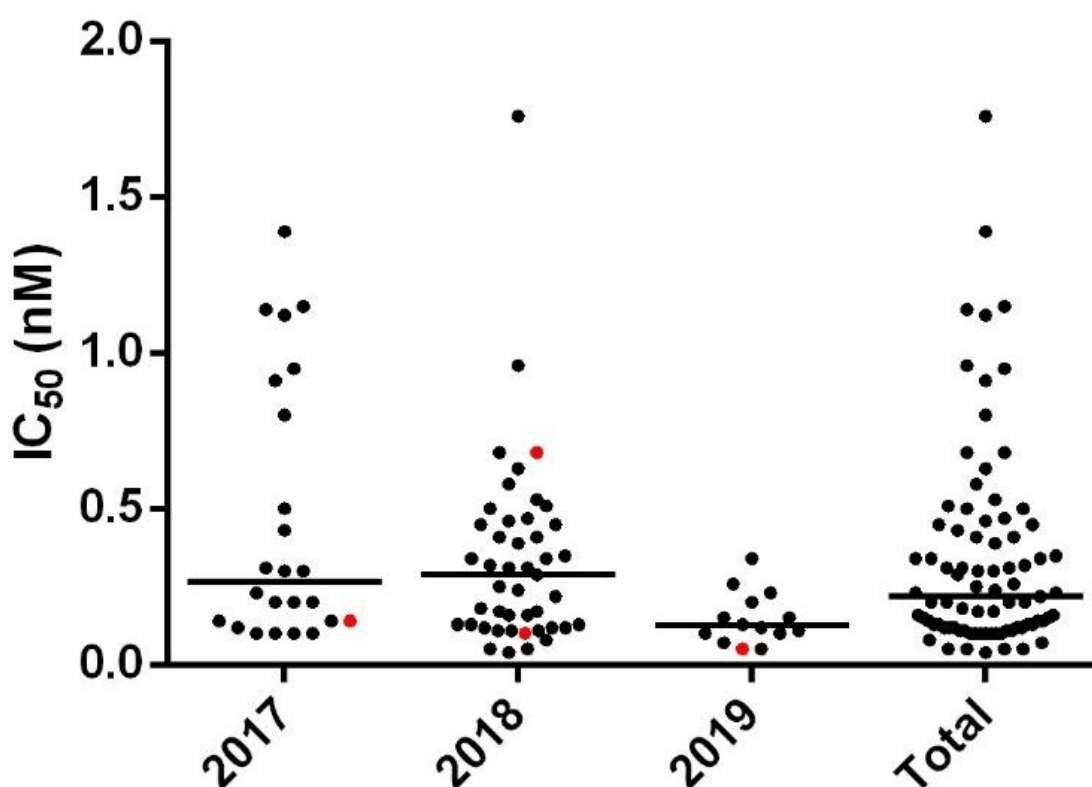


Figura 4.3 - Valores de IC₅₀ do fármaco OST para isolados brasileiros do vírus A(H3N2), dos anos de 2017, 2018, 2019 e total.

Os isolados foram titulados e os seus valores de IC₅₀ ao OST (nM) foram determinados utilizando o ensaio NA-Star™. Cada ponto representa o valor de IC₅₀ (nM) para cada isolado, e a mediana de cada ano é representada pela linha preta. Os pontos vermelhos representam os isolados correspondentes aos isolados com as substituições Y155H e V149A. Fonte: Sousa, TC. 2021

5 DISCUSSÃO

A vigilância global dos FluVs é coordenada pelo GISRS, órgão pertencente à WHO. Amostras destes vírus são coletadas por laboratórios em várias regiões do mundo, analisadas nos centros nacionais de influenza (NICs) e parcialmente enviadas para um dos sete centros colaboradores (CCs) da WHO para Referência e Pesquisa sobre influenza. Estes vírus são analisados com relação as suas propriedades antigênicas, genéticas e de suscetibilidade antiviral. O LVRS é um dos NICs para a WHO e faz o monitoramento de FluVs resistentes aos antivirais, tendo detectado, nos últimos anos, a circulação de variantes com marcadores de RS aos NAIs. Foi relatada a ocorrência de variantes do vírus A(H1N1)pdm09 com as substituições H275Y, S247N e I223K, ambas associadas à RS aos NAIs em pacientes com ou sem tratamento prévio, sugerindo então que alguns destes vírus poderiam estar sendo transmitidos na comunidade¹⁷¹. Algumas cepas também apresentaram as substituições permissivas V241I e N369K^{168,172}. Cabe ressaltar que os dados mostraram que um vírus contendo o marcador H275Y apresentou menor capacidade replicativa *in vitro*, e menor estabilidade térmica da NA, em comparação com os vírus selvagens¹⁷²

Dando seguimento a estes estudos, este trabalho analisou a circulação, no Brasil, de variantes de FluAV com marcadores associados à RS aos fármacos antivirais NAIs, adamantanos e BXM, no período de 2017 e 2020. No total, 1020 cepas de FluAV foram analisadas, oriundas de amostras de secreções respiratórias coletadas pela rede de vigilância epidemiológica de nove estados, sendo então recebidas no LVRS. Adicionalmente, 313 sequências genéticas de FluAV, circulantes em outras regiões do país não abrangidas pelo LVRS, foram obtidas através do banco de dados público GISAID e analisadas. Assim, por meio de análises moleculares, foram detectadas 39 cepas virais apresentando marcadores no gene NA e uma cepa com marcador no gene PA. Estes marcadores já foram descritos na literatura associados com RS aos NAI e ao fármaco BXM, respectivamente. Adicionalmente, foi detectada uma cepa de FluAV sem a substituição S31N no gene M2, que confere resistência aos FluAV contra os fármacos adamantanos e atualmente presente na maioria dos vírus circulantes.

Os casos de influenza analisados neste estudo foram reportados majoritariamente (80,0%) nas estações mais frias do ano, como outono e inverno. Tal perfil de incidência, em períodos mais frios, está de acordo com outros estudos já

publicados^{6,7}. Estes estudos indicam que a transmissão de influenza é afetada pelas variações de temperatura e umidade relativa do ar, sendo mais eficiente em temperaturas mais baixas e clima mais seco (baixa umidade relativa do ar)¹⁹³. Além disso, em períodos mais frios, as pessoas tendem a ficar em locais fechados, favorecendo a disseminação do vírus. Cabe ressaltar que, neste estudo, a maior incidência de casos é das regiões sudeste (36,1%) e sul (47,9%), que são as regiões do Brasil que apresentam as temperaturas mais baixas e, no caso da região sul, clima temperado. Outro ponto relevante é em relação ao perfil de utilização do OST. Dos 329 indivíduos que foram submetidos à terapia com o OST, 216 (65,6%) apresentaram SRAG, 82 (24,9%) eram idosos e 52 (15,8%) foram menores de 5 anos. Além disso, 129 (39,2%) pessoas iniciaram o tratamento com o OST até 48h do início dos sintomas, os demais indivíduos (60,8%) iniciaram o OST após as primeiras 48h. De acordo com a WHO e MS, o público alvo prioritário para receber a terapia com o OST é de pacientes em condição de SRAG; com SG maiores de 60 anos ou menores de 5 anos, portadores de comorbidades e imunodeprimidos e, para se ter maior eficácia, o tratamento com o OST deve ser iniciado em até 48h após o início dos sintomas². Ademais, um tempo maior de *shedding viral*, pode contribuir para a emergência de mutações no genoma viral e afetar a eficácia do tratamento.

Ao analisar as sequências de NA das cepas de FluAV, foi detectada a substituição H275Y na amostra do subtipo A(H1N1)pdm09, A/Espirito Santo/974/2019. Todavia, como não foi possível de realizar o isolamento viral desta amostra, não foi possível realizar a validação funcional da RS desta amostra ao OST. Cabe salientar que este marcador foi identificado através de triagem molecular com metodologia de maior processividade no momento do estudo, apresentando 100% de sua população viral mutada, indicando uma adenina no lugar de uma guanina. Visto que o tempo entre a data de início de sintomas e data de coleta foi muito curto e como o paciente iniciou a terapia com o OST na mesma data da coleta, desfavorece-se a hipótese de que alguma pressão seletiva, pelo uso do antiviral, poderia contribuir para a seleção de subpopulações virais que apresentem esta substituição. Dessa forma, é possível que este vírus já tenha infectado o hospedeiro abrigando esta substituição, oriunda de circulação na comunidade. Por este motivo, estudos suplementares, com outras amostras do mesmo período e região desta encontrada foram realizados, porém não foram detectadas outras amostras carreando essa mutação.

A substituição H275Y é o marcador mais frequentemente detectado, sendo também o mais relevante do grupo de alterações conhecidas associadas com a RS

aos NAIs, gerando uma relevante variação no IC₅₀ dos isolados¹⁶⁵, mesmo quando a população viral se encontra parcialmente mutada no hospedeiro⁸⁶. Esta alteração genética impede que a molécula do OST se acomode corretamente no sítio ativo da NA, desta forma enfraquecendo a ligação do fármaco e diminuindo a efetividade do fármaco que de 260–2078 vezes ao OST e de 172–495 vezes ao PER em até 5000 vezes quando comparado com o NA WT. Por outro lado, essa mutação também causa diminuição do *fitness* viral^{172,194}, o que teoricamente dificulta seu espalhamento e substituição da população circulante. Entretanto, mutações permissivas, como R222Q, V234M, V241I, N369K e N386S na NA, agem compensando essa perda de *fitness*^{195,196}, estando já disseminadas no FluAV atualmente circulantes ao redor do mundo¹⁹⁷, inclusive do Brasil^{168,172}.

A H275Y é uma substituição classicamente relacionada com caracterização de resistência. Anteriormente à pandemia de A(H1N1)pdm09, mas ainda em 2009, foi observada a incorporação da mesma no genoma dos vírus A(H1N1) sazonais que estavam circulando no período, o que levou à resistência ao OST¹⁶³. Porém, com a emergência da variante pandêmica A(H1N1)pdm09 e substituição da cepa de A(H1N1) sazonal até então circulante, o novo vírus não apresentava a mutação em seu genoma e, desta forma, apresentava-se sensível ao tratamento com OST. Devido a sua importância, o monitoramento de cepas portando a H275Y é crucial para o uso contínuo dos NAIs.

Além da substituição H275Y, também foram identificados outros vírus A(H1N1)pdm09 carreando as substituições Y155H e S247N na NA, que são associadas com RS aos NAIs. A substituição do aminoácido tirosina (Y) pelo histidina (H) na posição 155 da proteína foi identificada em uma cepa de A(H1N1)pdm09 e em 23 cepas de A(H3N2), sendo detectada de maneira isolada ou associada com a alteração V149A. Relatos na literatura indicam que a Y155H cause ARS aos NAIs, quando presente em cepas do A(H1N1) sazonal¹⁶⁰. Entretanto, esse mesmo efeito ainda não foi observado quando a alteração está presente nos A(H1N1)pdm09 circulantes¹⁹⁸. Neste trabalho, foi possível isolar e avaliar funcionalmente 4 cepas de A(H3N2) carreando a Y155H e também foi observado um perfil de susceptibilidade normal ao OST, de acordo com os critérios da WHO, apesar de estar localizada em uma região conservada da NA. Assim, sugere-se que o contexto genômico em que as mutações se encontram pode se relacionar com o seu efeito, de acordo com o tipo da NA e o subtipo de FluAV¹⁶⁰. Enquanto isso, a alteração S247N, que também foi identificada em uma amostra de A(H1N1)pdm09, trata-se de uma substituição do

aminoácido serina (S) por uma asparagina (N), na posição 247 da NA do tipo 1. Nas amostras de A(H1N1) sazonal e pandêmico carreando somente este marcador, não foi relatada significativa redução da atividade antiviral do OST. Porém quando a S247N é encontrada associada à H275Y, a ligação do OST à NA é ainda mais abalada do que somente com a mutação H275Y¹⁹⁹, trazendo uma sinergia na capacidade de RS ao OST¹⁵⁷, o que gera uma preocupação iminente para seu monitoramento.

Com relação às substituições na NA nos vírus A(H3N2), foram identificadas I222V, V149A, N329K, Q136K, além da já comentada Y155H. Vale ressaltar que, para estes vírus, as substituições mais relevantes são a E119V (troca do aminoácido ácido glutâmico para valina), que causa perda de sensibilidade somente ao OST¹⁵⁹, e a substituição R292K (substituição da arginina para lisina)²⁰⁰ que causa redução de susceptibilidade a OST, ZAN e PER⁴⁷. Na posição 222 da NA, normalmente se encontra o aminoácido isoleucina (I). Porém, trocas para os aminoácidos lisina (K), leucina (L), arginina (R) e valina (V) já foram reportadas e são associadas com a RS aos NAIs. No total, foram identificadas seis amostras de A(H3N2) carreando a substituição I222V, que, semelhante a já comentada S247N, não causa relevante efeito inibitórios aos NAIs, quando presente sozinha. Entretanto, já foi relatado efeito sinérgico¹⁹⁹ quando a mesma se apresenta em conjunto com o marcador H275Y, em A(H1N1)pdm09 (encontrada na posição 223 na N1)²⁰¹, e com E119V, nos vírus A(H3N2)²⁰². Sendo assim, seu monitoramento também deve ser continuamente realizado.

O marcador mais frequentemente detectado nesse estudo foi o V149A, que foi detectado em 25 amostras de A(H3N2), sendo a sua maioria junto ao marcador Y155H. Esta substituição consiste na troca de uma valina (V) por uma alanina (A) na posição 149 da NA e a mesma já foi relatada como tendo o perfil de leve (8 vezes quando comparada com a WT (do inglês *Wild type*) de RS ao ZAN quando presente em cepas do vírus altamente patogênico A(H5N1)²⁰³, subtipo que possui origem aviária. Neste trabalho, esta substituição foi observada em quatro isolados de A(H3N2) que foram testadas contra o OST e todas apresentaram perfil de SN ao fármaco, de acordo com a classificação da WHO.

A substituição adicionalmente detectada em A(H3N2) foi a N329K, em A/EspíritoSanto/174/2017, em um indivíduo não pertencente a nenhum dos grupos de risco, mas que apresentava no momento da coleta quadro clínico de SRAG e começou a utilização do OST na data da coleta da amostra. Apesar do isolamento desta amostra não ter sido possível, esta substituição já foi descrita associada à RS ao OST

e ao ZAN^{165,169}. A mesma também foi relatada pela WHO como associada à RS ao OST após ser encontrada em amostras provenientes de alguns países europeus¹⁶⁵.

O último marcador detectado em A(H3N2) foi o Q136K, localizado na amostra A/Rio Grande do Sul/1035/2019 e consiste na troca do aminoácido glutamina (Q) pelo aminoácido lisina (K). Essa substituição não causa efeitos na susceptibilidade ao OST, mas causa alta redução de susceptibilidade aos ZAN e redução de susceptibilidade ao PER tanto em cepas de A(H1N1) sazonal²⁰⁴ quanto de A(H3N2)²⁰⁵. Curiosamente, os relatos de emergência dessa mutação foram após o isolamento em células MDCK, sugerindo que seja mais frequentemente selecionada após passagem em cultura de células^{204,206}.

Neste estudo, foram detectadas 39 amostras contendo alguma substituição na NA, que tenham relação, de alguma forma, com alguma alteração na susceptibilidade aos fármacos NAIs, sendo a maioria (92,3%) presente no subtipo A(H3N2). Quanto ao perfil etário dos indivíduos cujas amostras apresentavam algum marcador de interesse, 10 (25,6%) são provenientes de pacientes idosos (>65 anos), que é um dos grupos de risco para infecção por FluV. No tocante à gravidade da doença, somente 14 amostras vieram acompanhadas das informações clínicas para sua classificação, das quais 5 (35,7%) eram provenientes de pacientes que apresentaram sintomas de SRAG. Indivíduos idosos, crianças, com comorbidades, transplantados, imunodeprimidos, entre outros, são classificados pela WHO como pertencentes aos grupos de risco e a condição imunológica deficitária desses grupos tende a combater menos as infecções virais, permitindo ao patógeno um organismo mais propício à sua multiplicação. Conseqüentemente, aumenta-se a probabilidade de prolongar o tempo de infecção do vírus no indivíduo (*shedding* viral prolongado), que replicaria mais seu material genético, aumentaria a probabilidade do surgimento de mutações e seleção natural de subpopulações com propriedades mais vantajosas para o patógeno.

As substituições na NA são uma preocupação constante para a vigilância em saúde pública, uma vez que elas podem afetar diretamente a utilização dos NAIs, que são inclusive estocados em todo o mundo. Diversos fatores podem contribuir para a emergência e seleção dessas mutações nas populações virais circulantes, tais como o uso exagerado dos fármacos causando pressão seletiva, fatores relacionados ao hospedeiro (presença de comorbidades, faixa etária, imunodeficiência, etc) causando *shedding* prolongado, além do processo de evolução viral que pode levar ao surgimento de substituições de maneira espontânea no genoma do vírus.

Atualmente, de acordo com a WHO, a frequência global dos FluAVs com marcadores associados com a resistência aos NAIs é de 0,5%¹⁶⁵. No Brasil, dados recentes, para os vírus A(H1N1)pdm09, apontam uma frequência de 0,6%¹⁷². Nesse estudo, não foi possível isolar a maior parte das amostras que apresentavam mutações de interesse. Dos 231 isolados do subtipo A(H1N1)pdm09 e 83 de A(H3N2) que apresentavam as alterações Y155H e I222V, todos apresentaram perfil de SN ao OST. Cabe ressaltar que, apesar de não ter sido avaliada funcionalmente, a amostra A/Espirito Santo/974/2019, por ter o marcador H275Y, o qual é amplamente associado à resistência ao OST, pode ser considerada com RS ao OST.

Em relação ao gene M2, que é o gene de interesse para triagem de mutações de resistência aos fármacos adamantanos, das 457 sequências de FluAV disponíveis analisadas neste estudo, 456 apresentaram o marcador de resistência S31N, seguindo o que já era observado em todo mundo. Entretanto, foi detectada a amostra de A(H3N2), A/Brazil/358/2017, que não apresentava nenhum dos marcadores de resistência aos adamantanos. Porém, não foi observada disseminação dessa cepa teoricamente susceptível, uma vez que todas as demais amostras da mesma região e período apresentavam o marcador S31N no gene M2. No ano de 2017, a circulação de FluAV foi predominante do subtipo A(H3N2), curiosamente, neste ano foram detectados na Austrália *clusters* de A(H3N2) também sem nenhum marcador de resistências aos adamantanos. Um total de 15 cepas sensíveis aos adamantanos (número maior do que o total de detectado no em todo mundo entre 2011 e 2016) foram detectadas, principalmente na região de Victoria (região central da Austrália) durante o 3º trimestre do ano¹³³, mas, no geral, esses grupos virais também não conseguiram se propagar de forma ampla. Os dados deste estudo são apresentados de forma pioneira, no Brasil, sendo também um dos poucos realizados na América Latina²⁰⁷ e este monitoramento pode representar uma possibilidade, ainda que distante, para que, no futuro, a classe dos adamantanos volte a ser uma ferramenta eficaz no tratamento contra infecções pelos FluAV. Sendo assim, este tipo monitoramento contínuo é altamente recomendado.

Por fim, foi avaliado as sequências do gene PA, alvo do fármaco BXM, da classe dos inibidores de endonuclease dependente de cap. Este gene é uma região bastante conservada do genoma viral, principalmente devido a sua função essencial para a replicação do patógeno. Foi detectada uma amostra de A(H3N2), proveniente do ano de 2017, do estado do Paraná, com um marcador em uma posição já associada à RS ao BXM. A cepa A/Brazil/339/2017 apresentou a substituição E199D.

Apesar de não haver relato da função desta alteração na PA viral, já foi relatado que a substituição no mesmo sítio, E199G, que foi identificada em uma amostra de A(H3N2) conferiria uma leve RS (4,5 vezes) ao BXM¹⁸². Até o momento, a posição 38 da PA é a mais relevante em relação a susceptibilidade do BXM. Nesse *locus*, normalmente, encontra-se o aminoácido isoleucina (I), mas já foram relatadas substituições para treonina (T), fenilalanina (F), metionina (M), asparagina (N) serina (S), leucina (L) e valina (V), sendo a mutação I38T a que causa maior efeito de RS ao BXM¹⁷⁶. Como se trata de um fármaco recém liberado somente no mercado de alguns países, estudos relacionados ao monitoramento das mudanças genéticas no gene da PA relacionando-as a seu impacto na atividade antiviral do fármaco ainda devem ser realizados.

Nos tempos atuais de pandemia de COVID-19, a importância dos antivirais como 1º linha de defesa é notável, pois podem suprimir o impacto de uma doença causado por um novo vírus até o desenvolvimento e produção de vacinas eficazes. Uma vez que há antivirais efetivos disponíveis contra influenza, como é o caso dos NAIs OST e ZAN, que são utilizados e distribuídos pelo SUS, estudos como este, que demonstram que a maioria dos FluAVs circulantes no Brasil não apresentam marcadores de resistência são fundamentais para auxiliar condutas clínicas e a políticas públicas quanta a compra e armazenagem destes fármacos.

6 PERSPECTIVAS

- Introdução das tecnologias de NGS (*Illumina™*) para sequenciamento do genoma viral completo.
- Aumento do número de amostras monitoradas, por ano.
- Implementação de análises funcionais de susceptibilidade dos isolados virais aos fármacos ZAN e BXM.
- Intensificação do monitoramento de clusters de disseminação viral.
- Ampliação das análises moleculares e funcionais para os FluBVs.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a detecção de mutações nos FluAV circulantes no Brasil associadas às três classes farmacológicas liberadas para uso como antivirais anti-influenza no mundo.

Nas análises apresentadas, foi detectado o marcador de RS aos NAIs H275Y em 1 amostra. Adicionalmente, foram localizadas as alterações S247N e I222V isoladamente em 1 e 6 amostras, respectivamente. Como, quando em associação com H275Y, apresentam ARS aos NAIs, estas têm a necessidade de monitoramento contínuo. Outras substituições, como Y155H e V149A, apesar de já terem sido relatados como associados à RS aos NAIs, também foram identificados em 24 e 25 amostras. Entretanto, nas análises funcionais de 4 isolados com estas alterações, foi observado perfil de SN ao OST.

Entre as cepas identificadas no LVRS carreando mutações associadas a RS aos NAIs, 64% foram coletadas durante as estações de outono/inverno e mais de 90% dessas cepas vieram das regiões sul/ sudeste, que são os períodos e regiões de maior circulação do agente. 29% das cepas mutadas foram recuperadas de indivíduos em condição de SRAG, ressaltando que a condição clínica pode contribuir para a emergência de mutações associadas com a RS aos antivirais. Uma preocupação é da ausência de informações valiosas referente a clínica e comorbidades dos indivíduos nas fichas clinico-epidemiológica, diversas amostras vieram de indivíduos com informações incompletas e/ou ausentes.

Foi determinado que os FluAV circulantes no Brasil, apresentam perfil similar ao restante do mundo, com relação à presença do marcador de resistência aos adamantanos S31N. Todavia, foi identificada uma amostra de A(H3N2), que circulou no ano de 2017, sem este marcador de resistência, porém não houve detecção de disseminação desta variante viral.

O monitoramento da frequência de mutações associadas à resistência ao BXM levou a identificação de uma cepa de A(H3N2) carreando uma substituição na posição 199 da PA (E199D), que está em uma posição relevante para a susceptibilidade ao BXM. Entretanto, todos os outros 435 amostras e sequências genéticas não apresentaram marcadores de resistência ao BXM, o que é importante caso haja a futura aprovação deste fármaco no Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hussain, M., Galvin, H. D., Haw, T. Y., Nutsford, A. N. & Husain, M. Drug resistance in influenza a virus: The epidemiology and management. *Infect. Drug Resist.* **10**, 121–134 (2017).
2. Brasil, M. da saúde. *Guia de vigilância em saúde 3ª edição. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços* (2019).
3. Influenza (Seasonal). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
4. Petrova, V. N. & Russell, C. A. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 47–60 (2018).
5. Putri, W. C. W. S., Muscatello, D. J., Stockwell, M. S. & Newall, A. T. Economic burden of seasonal influenza in the United States. *Vaccine* **36**, 3960–3966 (2018).
6. Caini, S. *et al.* Temporal Patterns of Influenza A and B in Tropical and Temperate Countries: What Are the Lessons for Influenza Vaccination? *PLoS One* **11**, e0152310 (2016).
7. Zhao, N., Cao, G., Vanos, J. K. & Vecellio, D. J. The effects of synoptic weather on influenza infection incidences: a retrospective study utilizing digital disease surveillance. *Int. J. Biometeorol.* **62**, 69–84 (2018).
8. Iuliano, A. D. *et al.* Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet (London, England)* **391**, 1285–1300 (2018).

9. Nickol, M. E. & Kindrachuk, J. A year of terror and a century of reflection: Perspectives on the great influenza pandemic of 1918-1919. *BMC Infectious Diseases* vol. 19 117 (2019).
10. Pappas, G., Kiriaze, I. J. & Falagas, M. E. Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *International Journal of Infectious Diseases* vol. 12 347–350 (2008).
11. Barberis, I., Myles, P., Ault, S. K., Bragazzi, N. L. & Martini, M. History and evolution of influenza control through vaccination: From the first monovalent vaccine to universal vaccines. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* vol. 57 E115–E120 (2016).
12. Potter, C. W. A history of influenza. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 572–579 (2001).
13. Cantarino Da Costa, L. M. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários*. *Rev Pan-Amaz Saude* **7**, 11–25 (2016).
14. The Diffusion of Influenza: Patterns and Paradigms - Gerald F. Pyle - Google Books. https://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=7w-H11vMykgC&oi=fnd&pg=PR9&dq=The+diffusion+of+influenza:+patterns+and+paradigms.+New+Jersey:&ots=atLPUCGKe&sig=o6HwI0vrTDI01wTgg_d7CoKKdo#v=onepage&q=The+diffusion+of+influenza%3A+patterns+and+paradigms.+New+Jersey%3A&f=false.
15. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases* vol. 12 15–22 (2006).
16. Crosby, A. *America's forgotten pandemic: the influenza of 1918*. (2003).

17. Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Fields Virology 6th edition; Chapter 41: Orthomyxoviruses*. vol. 1 (2013).
18. Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. Initial Genetic Characterization of the 1918 “Spanish” Influenza Virus. *Science (80-.)*. **275**, 1793 LP – 1796 (1997).
19. Morens, D. M., Taubenberger, J. K., Harvey, H. A. & Memoli, M. J. The 1918 influenza pandemic: Lessons for 2009 and the future. *Crit. Care Med.* **38**, e10 (2010).
20. Coura, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 1173–1173 (2015).
21. Smith, W., Andrewes, C. H. & Laidlaw, P. P. A VIRUS OBTAINED FROM INFLUENZA PATIENTS. *Lancet* **222**, 66–68 (1933).
22. Francis, T. A new type of virus from epidemic influenza. *Science* vol. 92 405–408 (1940).
23. Taylor, R. M. A further note on 1233 (‘influenza C’) virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **4**, 485–500 (1951).
24. Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**, 13–20 (1978).
25. Kumar, B. *et al.* The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. *Arch. Virol.* **163**, 831–844 (2018).
26. Monto, A. S. & Kendal, A. P. EFFECT OF NEURAMINIDASE ANTIBODY ON HONG KONG INFLUENZA. *Lancet* **301**, 623–625 (1973).

27. Monto, A. S. & Webster, R. G. Influenza pandemics: History and lessons learned. in *Textbook of Influenza* 20–34 (John Wiley & Sons, Ltd, 2013). doi:10.1002/9781118636817.ch2.
28. Smith, G. J. D. *et al.* Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza a epidemic. *Nature* **459**, 1122–1125 (2009).
29. Mamun, M. M. A. & Huda, A. K. M. N. Origins and evolutionary genomics of the novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans -past and present perspectives. *Yakugaku Zasshi* vol. 131 553–562 (2011).
30. Jain, S. *et al.* Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2605–2615 (2009).
31. Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M. & Kieny, M. P. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* vol. 28 4895–4902 (2010).
32. WHO | World now at the start of 2009 influenza pandemic. *WHO* (2010).
33. Dawood, F. S. *et al.* Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2605–2615 (2009).
34. Dawood, F. S. *et al.* Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 687–695 (2012).
35. Gao, G. F. & Sun, Y. It is not just AIV: From avian to swine-origin influenza virus. *Sci. China Life Sci.* **53**, 151–153 (2010).
36. Hause, B. M. *et al.* Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* **5**, (2014).

37. Tong, S. *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4269–4274 (2012).
38. Tong, S. *et al.* New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003657 (2013).
39. Osterhaus, A. D. M. E., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E. E., Bestebroer, T. M. & Fouchier, R. A. M. Influenza B virus in seals. *Science (80-.)*. **288**, 1051–1053 (2000).
40. Long, J. S., Mistry, B., Haslam, S. M. & Barclay, W. S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* vol. 17 67–81 (2019).
41. WHO | Influenza A(H1N2) variant virus – Brazil. <https://www.who.int/csr/don/04-january-2021-influenza-a-brazil/en/>.
42. Human infection with avian influenza A(H10N3) – China. [https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/human-infection-with-avian-influenza-a\(h10n3\)-china](https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/human-infection-with-avian-influenza-a(h10n3)-china).
43. Li, Y. T., Linster, M., Mendenhall, I. H., Su, Y. C. F. & Smith, G. J. D. Avian influenza viruses in humans: Lessons from past outbreaks. *British Medical Bulletin* vol. 132 81–95 (2019).
44. Ghebrehewet, S., MacPherson, P. & Ho, A. Influenza. *Bmj* **6258**, i6258 (2016).
45. Memoli, M. J. *et al.* The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 214–224 (2014).

46. Ison, M. G. & Hirsch, H. H. Editorial: Influenza: A recurrent challenge to transplantation. *Transplant Infectious Disease* vol. 12 95–97 (2010).
47. Gubareva, L. V. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. *Antiviral Res.* **146**, 12–20 (2017).
48. Lofgren, E., Fefferman, N. H., Naumov, Y. N., Gorski, J. & Naumova, E. N. Influenza Seasonality: Underlying Causes and Modeling Theories. *J. Virol.* **81**, 5429–5436 (2007).
49. Lowen, A. C. & Steel, J. Roles of Humidity and Temperature in Shaping Influenza Seasonality. *J. Virol.* **88**, 7692–7695 (2014).
50. CDC's World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza | CDC. <https://www.cdc.gov/flu/weekly/who-collaboration.htm>.
51. WHO Collaboration Centers & ERLs. <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system/who-collaboration-center-erl>.
52. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
53. Cox, N. J. & Subbarao, K. Influenza 1999. **354**, 1277–1282 (2005).
54. Shaw, M. L. & Palese, P. Fields virology, p 1151–1185. *Fields Virology*. 6th ed. Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, PA (2013).
55. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**, D49 (2008).

56. Ghedin, E. *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* **437**, 1162–1166 (2005).
57. Einfeld, A. J., Neumann, G. & Kawaoka, Y. At the centre: Influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology* vol. 13 28–41 (2015).
58. Breen, M., Nogales, A., Baker, S. F. & Martínez-Sobrido, L. Replication-competent influenza A viruses expressing reporter genes. *Viruses* vol. 8 1–28 (2016).
59. Pflug, A., Lukarska, M., Resa-Infante, P., Reich, S. & Cusack, S. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Research* vol. 234 103–117 (2017).
60. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *J. Virol.* **87**, 2455–2462 (2013).
61. Hutchinson, E. C. *et al.* Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat. Commun.* **5**, 4816 (2014).
62. McCrone, J. T. *et al.* Stochastic processes constrain the within and between host evolution of influenza virus. *Elife* **7**, (2018).
63. Nakatsu, S. *et al.* Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes. *J. Virol.* **92**, (2018).
64. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* **9**, 1581 (2018).

65. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology* vol. 9 1581 (2018).
66. De Vlugt, C., Sikora, D. & Pelchat, M. Insight into influenza: A virus capsid snatching. *Viruses* vol. 10 (2018).
67. Russell, C. J., Hu, M. & Okda, F. A. Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends in Microbiology* vol. 26 841–853 (2018).
68. Lazniewski, M., Dawson, W. K., Szczepińska, T. & Plewczynski, D. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site. *Brief. Funct. Genomics* **17**, 415–427 (2018).
69. McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E. & McKimm-Breschkin, J. L. Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
70. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H.-D. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J. Virol.* **78**, 12665–12667 (2004).
71. Rossman, J. S. & Lamb, R. A. Influenza virus assembly and budding. *Virology* vol. 411 229–236 (2011).
72. Shtykova, E. V. *et al.* Structural analysis of influenza a virus matrix protein M1 and its self-assemblies at low pH. *PLoS One* **8**, 82431 (2013).
73. Musharrafieh, R. *et al.* Investigation of the Drug Resistance Mechanism of M2-S31N Channel Blockers through Biomolecular Simulations and Viral Passage Experiments. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **3**, 666–675 (2020).

74. Schmidt, N. W., Mishra, A., Wang, J., Degrado, W. F. & Wong, G. C. L. Influenza virus A M2 protein generates negative gaussian membrane curvature necessary for budding and scission. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13710–13719 (2013).
75. Herold, S., Becker, C., Ridge, K. M. & Budinger, G. R. S. Influenza virus-induced lung injury: Pathogenesis and implications for treatment. *Eur. Respir. J.* **45**, 1463–1478 (2015).
76. Byrd-Leotis, L., Cummings, R. D. & Steinhauer, D. A. The interplay between the host receptor and influenza virus hemagglutinin and neuraminidase. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 1541 (2017).
77. Edinger, T. O., Pohl, M. O. & Stertz, S. Entry of influenza A virus: Host factors and antiviral targets. *Journal of General Virology* vol. 95 263–277 (2014).
78. York, A., Hengrung, N., Vreede, F. T., Huiskonen, J. T. & Fodor, E. Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4238–E4245 (2013).
79. Crépin, T. *et al.* Mutational and Metal Binding Analysis of the Endonuclease Domain of the Influenza Virus Polymerase PA Subunit. *J. Virol.* **84**, 9096–9104 (2010).
80. Nayak, D. P., Hui, E. K. W. & Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* **106**, 147–165 (2004).
81. Jung, H. E. & Lee, H. K. Host protective immune Responses against influenza a virus infection. *Viruses* vol. 12 504 (2020).
82. Ahlquist, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* vol. 296 1270–1273 (2002).

83. Shao, W., Li, X., Goraya, M. U., Wang, S. & Chen, J. L. Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 (2017).
84. Zambon, M. C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. in *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* vol. 44 3–9 (Oxford University Press, 1999).
85. Goka, E. A., Vallely, P. J., Mutton, K. J. & Klapper, P. E. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Archives of Virology* vol. 159 3167–3183 (2014).
86. Takashita, E. *et al.* Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017–2018. *Antiviral Res.* **175**, 104718 (2020).
87. Meijer, A. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Res.* **110**, 31–41 (2014).
88. Takashita, E. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res.* **117**, 27–38 (2015).
89. Hurt, A. C. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015. *Antiviral Res.* **132**, 178–185 (2016).
90. Gubareva, L. V. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. *Antiviral Res.* **146**, 12–20 (2017).
91. Resende, P. C. *et al.* Whole-genome characterization of a novel human influenza

- A(H1N2) virus variant, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* vol. 23 152–154 (2017).
92. van der Sandt, C. E., Kreijtz, J. H. C. M. & Rimmelzwaan, G. F. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses* vol. 4 1438–1476 (2012).
 93. Short, K. R., Brooks, A. G., Reading, P. C. & Londrigan, S. L. The fate of influenza A virus after infection of human macrophages and dendritic cells. *Journal of General Virology* vol. 93 2315–2325 (2012).
 94. Chen, X. *et al.* Host immune response to influenza A virus infection. *Frontiers in Immunology* vol. 9 (2018).
 95. Chen, X. *et al.* Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front. Immunol.* **9**, 320 (2018).
 96. Wu, S., Metcalf, J. P. & Wu, W. Innate immune response to influenza virus. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 235–240 (2011).
 97. Mibayashi, M. *et al.* Inhibition of Retinoic Acid-Inducible Gene I-Mediated Induction of Beta Interferon by the NS1 Protein of Influenza A Virus. *J. Virol.* **81**, 514–524 (2007).
 98. García-Sastre, A. *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon- deficient systems. *Virology* **252**, 324–330 (1998).
 99. Kreijtz, J. H. C. M., Fouchier, R. A. M. & Rimmelzwaan, G. F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Research* vol. 162 19–30 (2011).
 100. Barberis, I., Martini, M., Iavarone, F. & Orsi, A. Available influenza vaccines:

Immunization strategies, history and new tools for fighting the disease. *J. Prev. Med. Hyg.* **57**, E41–E46 (2016).

101. Influenza Book | Vaccines. <http://www.influenzareport.com/ir/vaccines.htm>.
102. Peteranderl, C., Herold, S. & Schmoldt, C. Human Influenza Virus Infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 487–500 (2016).
103. Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J. P. & Kersten, G. F. A. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **94**, 251–263 (2015).
104. Kim, H., Webster, R. G. & Webby, R. J. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol.* **31**, 174–183 (2018).
105. Bosaeed, M. & Kumar, D. Seasonal influenza vaccine in immunocompromised persons. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* vol. 14 1311–1322 (2018).
106. Pebody, R. *et al.* End-of-season influenza vaccine effectiveness in adults and children, United Kingdom, 2016/17. *Eurosurveillance* **22**, (2017).
107. Hussain, A., Ali, S., Ahmed, M. & Hussain, S. The Anti-vaccination Movement: A Regression in Modern Medicine. *Cureus* (2018) doi:10.7759/cureus.2919.
108. Jefferson, T. *et al.* Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2014 (2014).
109. Zambon, M. Developments in the treatment of severe influenza: Lessons from the pandemic of 2009 and new prospects for therapy. *Current Opinion in Infectious Diseases* vol. 27 560–565 (2014).

110. Muthuri, S. G. *et al.* Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: A meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir. Med.* **2**, 395–404 (2014).
111. N, S. *et al.* Experience with oseltamivir in the control of nursing home influenza A outbreak. *Intern. Med.* **41**, 366–370 (2002).
112. Dolin, R. *et al.* A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N. Engl. J. Med.* **307**, 580–584 (1982).
113. Bright, R. A., Shay, D. K., Shu, B., Cox, N. J. & Klimov, A. I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* **295**, 891–894 (2006).
114. Król, E., Rychłowska, M. & Szewczyk, B. Antivirals--current trends in fighting influenza. *Acta Biochim. Pol.* **61**, 495–504 (2014).
115. Musharrafieh, R., Ma, C. & Wang, J. Discovery of M2 channel blockers targeting the drug-resistant double mutants M2-S31N/L26I and M2-S31N/V27A from the influenza A viruses. *Eur. J. Pharm. Sci.* **141**, (2020).
116. Shin, W. J. & Seong, B. L. Novel antiviral drug discovery strategies to tackle drug-resistant mutants of influenza virus strains. *Expert Opinion on Drug Discovery* vol. 14 153–168 (2019).
117. Stiver, G. The treatment of influenza with antiviral drugs. *Cmaj* **168**, 49–57 (2003).
118. Ison, M. G. & Hayden, F. G. Therapeutic options for the management of influenza. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 1 482–490 (2001).

119. Gasparini, R. & Nicolini, F. E. L. B. A. Compounds with anti-influenza activity : present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza Part II : Future compounds against influenza virus Compounds with anti-influenza activity : present and future of strategies fo. 69–85 (2014).
120. Hayden, F. G. *et al.* Comparative toxicity of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 226 (1981).
121. Mondal, D. Rimantadine☆. in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier, 2016). doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.99410-8.
122. Hayden, F. G. Antiviral Resistance in Influenza Viruses — Implications for Management and Pandemic Response. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068030> **354**, 785–788 (2009).
123. Hayden, F. G. & Hay, A. J. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. 176 119–130 (1992).
124. Belshe, R. B., Smith, M. H., Hall, C. B., Betts, R. & Hay, A. J. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. *J. Virol.* **62**, 1508–1512 (1988).
125. Nguyen, J. T. *et al.* Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine-resistant influenza a viruses. *PLoS One* **7**, (2012).
126. Baranovich, T. *et al.* Influenza A viruses of swine circulating in the United States during 2009–2014 are susceptible to neuraminidase inhibitors but show lineage-dependent resistance to adamantanes. *Antiviral Res.* **117**, 10 (2015).

127. Cheung, C. *et al.* Distribution of Amantadine-Resistant H5N1 Avian Influenza Variants in Asia. *J. Infect. Dis.* **193**, 1626–1629 (2006).
128. Hay, A. J., Zambon, M. C., Wolstenholme, A. J., Skehel, J. J. & Smith, M. H. Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**, 19–29 (1986).
129. Dong, G. *et al.* Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): Frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS One* **10**, 1–20 (2015).
130. Wang, J. *et al.* Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1315 (2013).
131. Hayden, F. G. Antiviral resistance in influenza viruses - Implications for management and pandemic response. *New England Journal of Medicine* vol. 354 785–788 (2006).
132. Beigel, J. & Bray, M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res.* **78**, 91–102 (2008).
133. Hurt, A. *et al.* Detection of adamantane-sensitive influenza A(H3N2) viruses in Australia, 2017: a cause for hope? *Eurosurveillance* **22**, 17–00731 (2017).
134. S, T., M, J., C, S.-L. & J, R. Neuraminidase inhibitors are effective and safe in reducing influenza complications: meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Intern. Med.* **86**, 54–65 (2021).
135. Moscona, A. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1363–1373 (2005).

136. Whitley, R. J. *et al.* Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**, 127–133 (2001).
137. Bassetti, M., Castaldo, N. & Carnelutti, A. Neuraminidase inhibitors as a strategy for influenza treatment: pros, cons and future perspectives. *Expert Opin. Pharmacother.* **20**, 1711–1718 (2019).
138. Abed, Y. & Boivin, G. A Review of Clinical Influenza A and B Infections With Reduced Susceptibility to Both Oseltamivir and Zanamivir. *Open Forum Infect. Dis.* **4**, (2017).
139. Von Itzstein, M. *et al.* Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**, 418–423 (1993).
140. Gubareva, L. V., Kaiser, L. & Hayden, F. G. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* vol. 355 827–835 (2000).
141. Meindl, P., Bodo, G., Palese, P., Schulman, J. & Tuppy, H. Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology* **58**, 457–463 (1974).
142. Mckimm-Breschkin, J. L. Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and other Respiratory Viruses* vol. 7 25–36 (2013).
143. Singh, N., Anjum, N. & Chandra, R. Combating influenza: natural products as neuraminidase inhibitors. *Phytochemistry Reviews* vol. 18 69–107 (2019).
144. Moss, R. B., Davey, R. T., Steigbigel, R. T. & Fang, F. Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance. doi:10.1093/jac/dkq100.

145. Ison, M. G. Clinical use of approved influenza antivirals: Therapy and prophylaxis. *Influenza Other Respi. Viruses* **7**, 7–13 (2013).
146. Loregian, A., Mercorelli, B., Nannetti, G., Compagnin, C. & Palù, G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3659–3683 (2014).
147. Allen, U. D., Aoki, F. Y. & Stiver, H. G. The use of antiviral drugs for influenza: Recommended guidelines for practitioners. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* vol. 17 273–284 (2006).
148. Russell, R. J. *et al.* The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nat.* 2006 4437107 **443**, 45–49 (2006).
149. Colman, P. M., Hoyne, P. A. & Lawrence, M. C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* **67**, 2972–2980 (1993).
150. Collins, P. J. *et al.* Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine* **27**, 6317–6323 (2009).
151. Malaisree, M. *et al.* Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **71**, 1908–1918 (2008).
152. Wang, M. Z., Tai, C. Y. & Mendel, D. B. Mechanism by which mutations at His274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3809–3816 (2002).
153. Pizzorno, A. *et al.* Impact of Mutations at Residue I223 of the Neuraminidase

- Protein on the Resistance Profile, Replication Level, and Virulence of the 2009 Pandemic Influenza Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1208 (2012).
154. Okomo-Adhiambo, M. *et al.* Neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance of influenza viruses circulating worldwide during the 2011 Southern Hemisphere season. *Influenza Other Respi. Viruses* **7**, 645 (2013).
 155. Ghedin, E. *et al.* Deep Sequencing Reveals Mixed Infection with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Strains and the Emergence of Oseltamivir Resistance. *J. Infect. Dis.* **203**, 168 (2011).
 156. Baek, Y. H. *et al.* Profiling and Characterization of Influenza Virus N1 Strains Potentially Resistant to Multiple Neuraminidase Inhibitors. *J. Virol.* **89**, 287 (2015).
 157. Hurt, A. C. *et al.* Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza a(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Eurosurveillance* **16**, 19884 (2011).
 158. Pizzorno, A., Bouhy, X., Abed, Y. & Boivin, G. Generation and Characterization of Recombinant Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. *J. Infect. Dis.* **203**, 25 (2011).
 159. Abed, Y., Baz, M. & Boivin, G. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir. Ther.* **11**, 971–6 (2006).
 160. Monto, A. S. *et al.* Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2395–402 (2006).

161. Collins, P. J. *et al.* Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine* **27**, 6317–6323 (2009).
162. Sheu, T. G. *et al.* Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3284–3292 (2008).
163. Hurt, A. C. *et al.* Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res.* **83**, 90–93 (2009).
164. Okomo-Adhiambo, M. *et al.* Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: A laboratory surveillance perspective. *Viruses* **2**, 2269–2289 (2010).
165. Lackenby, A. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Res.* **157**, 38–46 (2018).
166. Kelso, A. & Hurt, A. C. Drug-resistant influenza viruses: why fitness matters. (2012) doi:10.1038/nm.2954.
167. Butler, J. *et al.* Estimating the Fitness Advantage Conferred by Permissive Neuraminidase Mutations in Recent Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses. *PLoS Pathog.* **10**, e1004065 (2014).
168. Lopes E Souza, T. M. *et al.* Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm2009 strains found in Brazil are endowed with permissive mutations, which compensate the loss of fitness imposed by antiviral resistance. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 101–105 (2015).

169. Takashita, E. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013–2014. *Antiviral Res.* **117**, 27–38 (2015).
170. Souza, T. M. L. *et al.* Antiviral resistance surveillance for influenza A virus in Brazil: Investigation on 2009 pandemic influenza A (H1N1) resistance to oseltamivir. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**, 98–99 (2011).
171. Souza, T. M. L. *et al.* Detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1)pdm2009 in Brazil: Can community transmission be ruled out? *PLoS One* **8**, 1–6 (2013).
172. Matos, A. R. *et al.* Susceptibility of Brazilian influenza A(H1N1)pdm09 viruses to neuraminidase inhibitors in the 2014–2016 seasons: Identification of strains bearing mutations associated with reduced inhibition profile. *Antiviral Res.* **154**, 35–43 (2018).
173. Santos, K. C. de O. *et al.* INFLUENZA VIRUS SURVEILLANCE BY THE INSTITUTO ADOLFO LUTZ, INFLUENZA SEASON 2014: ANTIVIRAL RESISTANCE. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **57**, 92–92 (2015).
174. Mifsud, E. J., Hayden, F. G. & Hurt, A. C. Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral Res.* **169**, 104545 (2019).
175. Heo, Y. A. Baloxavir: First Global Approval. *Drugs* **78**, 693–697 (2018).
176. Gubareva, L. V. *et al.* Assessing baloxavir susceptibility of influenza viruses circulating in the United States during the 2016/17 and 2017/18 seasons. *Eurosurveillance* **24**, 9–13 (2019).
177. Xofluza | European Medicines Agency.

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xofluza>.

178. Noshi, T. *et al.* In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.* **160**, 109–117 (2018).
179. Koshimichi, H. *et al.* Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the Novel Anti-influenza Agent Baloxavir Marboxil in Healthy Adults: Phase I Study Findings. *Clin. Drug Investig.* **38**, 1189–1196 (2018).
180. Drug Trial Snapshot: XOFLUZA | FDA. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trial-snapshot-xofluza>.
181. Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* **379**, 913–923 (2018).
182. Omoto, S. *et al.* Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
183. Abed, Y., Saim-Mamoun, A. & Boivin, G. Fitness of influenza A and B viruses with reduced susceptibility to baloxavir: A mini-review. *Reviews in Medical Virology* (2020) doi:10.1002/rmv.2175.
184. Takashita, E. *et al.* Influenza a(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Eurosurveillance* **24**, 1–4 (2019).
185. Mengual-Chuliá, B. *et al.* Whole-genome analysis surveillance of influenza a virus resistance to polymerase complex inhibitors in Eastern Spain from 2016 to 2019. *Antimicrob. Agents Chemother.* **65**, 1–17 (2021).

186. Cissé, A. *et al.* Comparison of performance between Fast Track Diagnostics Respiratory Kit and the CDC global reference laboratory for influenza rRT-PCR panel for detection of influenza A and influenza B. *Influenza Other Respi. Viruses* **15**, 381 (2021).
187. Deyde, V. M. *et al.* Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses. *Antiviral Res.* **81**, 16–24 (2009).
188. Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. & Perez, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* *2001 14612* **146**, 2275–2289 (2001).
189. Centres, W. H. O. C., Cc, W. H. O. & November, R. WHO information for the molecular detection of influenza viruses It is strongly recommended that all un-subtypeable influenza A specimens of human origin , that may represent either seasonal viruses displaying significant genetic / antigenic drift or zoon. 1–63 (2018).
190. U, K., M, C., C, L. & E, Y. Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol. Biol.* **1836**, 59–88 (2018).
191. Sheu, T. G. *et al.* Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3284 (2008).
192. *Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire.* (2012).
193. Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog.* **3**, e151 (2007).

194. Abed, Y., Goyette, N. & Boivin, G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir. Ther.* **9**, 577–581 (2004).
195. Hurt, A. C. *et al.* Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *J. Infect. Dis.* **206**, 148–157 (2012).
196. JD, B., LI, G. & D, B. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* **328**, 1272–1275 (2010).
197. Liu, J. *et al.* Genetic and antigenic characterization of influenza A(H1N1)pdm09 in Yantai, China, during the 2009–2017 influenza season. *J. Med. Virol.* **91**, 351–360 (2019).
198. Perez-Sautu, U. *et al.* Y155H amino acid substitution in influenza A(H1N1)pdm09 viruses does not confer a phenotype of reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. *Eurosurveillance* (2014).
199. Pokorná, J. *et al.* Kinetic, thermodynamic, and structural analysis of drug resistance mutations in neuraminidase from the 2009 pandemic influenza virus. *Viruses* **10**, (2018).
200. van der Vries, E., Schutten, M., Fraaij, P., Boucher, C. & Osterhaus, A. Influenza Virus Resistance to Antiviral Therapy. *Adv. Pharmacol.* **67**, 217–246 (2013).
201. Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection in Two Summer Campers Receiving Prophylaxis --- North Carolina, 2009. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5835a1.htm>.
202. Baz, M., Abed, Y., McDonald, J. & Boivin, G. Characterization of Multidrug-

- Resistant Influenza A/H3N2 Viruses Shed during 1 Year by an Immunocompromised Child. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1555–1561 (2006).
203. Naughtin, M. *et al.* Neuraminidase inhibitor sensitivity and receptor-binding specificity of Cambodian clade 1 highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2004–2010 (2011).
204. Hurt, A. C., Holien, J. K., Parker, M., Kelso, A. & Barr, I. G. Zanamivir-Resistant Influenza Viruses with a Novel Neuraminidase Mutation. *J. Virol.* **83**, 10366–10373 (2009).
205. Dapat, C. *et al.* Rare influenza A (H3N2) variants with reduced sensitivity to antiviral drugs. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 493–496 (2010).
206. Okomo-Adhiambo, M. *et al.* Host cell selection of influenza neuraminidase variants: Implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Res.* **85**, 381–388 (2010).
207. Toledo-Rueda, W. *et al.* Antiviral resistance markers in influenza virus sequences in Mexico, 2000–2017. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1751–1756 (2018).

9 ANEXOS

Anexo 01. Substituições no gene NA dos FluAV, reportadas, associadas a RdS aos NAIs.

Tabela 9.1 - Quadro com as principais mutações na NAS associadas com RS aos NAIs.

NA = Neuraminidase. OST = Oseltamivir. ZAN = Zanamivir. PER = Peramivir. LAN = Laninavimivir. NI = Inibição normal. RI = Redução de Inibição. HRI = Alta redução de inibição. (*) = Número de vezes em que houve a redução de inibição em relação a mediana/ controle.

Adaptação:

https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/avwg2014_nai_substitution_table.pdf

Tipo/Subtipo	Substituição na NA	Susceptibilidade avaliada por ensaios de inibição da NA			
		OST	ZAN	PER	LAN
A(H1N1)pdm09	E119V	NI (3)	HRI (832)	RI (51)	-
	E119V	RI (600)	Hri (571)	RI (25)	-
	D199G	RI (17)	NI (6)	NI (2)	-
	I223K	RI (12-39)	NI (5-6)	NI (1-4)	-
	I223R	RI (28-45)	RI (10-12)	-	-
	I223V	NI (6)	NI (2)	NI (2)	-
	S247N	NI (4-8)	NI (2-5)	NI (1)	-
	H275Y	HRI (221-1637)	NI (1-6)	RI/HRI (50-751)	NI (1-2)
	N295S	HRI (208)	NI (3)	NI (3)	-
	D199N+H275Y	HRI (318-744)	NI (2-3)	HRI (108)	-
	I223K+H275Y	HRI (>10822)	RI (11)	HRI (5343)	RI (11)
	I223R+H275Y	HRI (>9100)	RI (27-22)	HRI (>7500)	RI (17)
	I223V+H275Y	HRI (1733)	NI (2) HRI	HRI (1331)	-
	S247N+H275Y	HRI (5880)	NI (5)	HRI (334)	-
A(H1N1)	Q313R+I427T	RI (10-43)	NI/RI (3-20)	NI (4)	-
	E119V	RI/HRI (15/1727)	HRI (136/2144)	HRI (5050)	-
	Q136K	NI (1)	RI/HRI (36-327)	RI (75-80)	-
	Y155H	HRI (123)	HRI (555)	-	-
	I223M	NI (8)	NI (1)	NI (1)	-
	I223V	NI (3)	NI (2)	NI (1)	-
	S247G	NI (5)	NI (1)	-	-
	H275Y	HRI (321-2597)	NI (1-2)	HRI (111-1095)	-

	R293K	NI (1)	RI (18)	-	-
	N295S	RI/HRI (40/197)	NI (1/5)	RI (12)	-
	I117V+E119V	NI (7)	HRI (391)	-	-
	I117M+E119V	RI (20)	HRI (181)	-	-
	I117V+H275Y	HRI (683)	NI (1)	-	-
	I117M+H275Y	HRI (395)	NI (1)	-	-
	I117V+N295S	RI (60)	NI (1)	-	-
	I117M+N295S	RI (52)	NI (4)	-	-
	E119V+ H275Y	RI (21)	HRI (132)	-	-
	Q136K+D151E	NI (1)	RI (25)	RI (18)	-
	Q136K+H275Y	HRI (198)	RI (15)	HRI (1805)	-
	D151E/N+H275Y	HRI (231-799)	NI (1-3)	RI/HRI (80-718)	-
	D151G+H275Y	HRI (1189)	RI (14)	HRI (1161)	-
	I223M+H275Y	HRI (1943)	NI (1)	HRI (400)	-
	I223V+H275Y	HRI (584/971)	NI (1/2)	HRI (893)	-
	I223V+N295S	RI (97)	NI (2)	-	-
	R293K+H275Y	HRI (207)	NI (1)	-	-
	N295S+H275Y	HRI (108)	NI (1)	-	-
	S334N+H275Y	HRI (415)	NI (1)	-	-
	I117V+N295S+H275Y	HRI (336)	RI (12)	-	-
	I117M+N295S+H275Y	HRI (121)	RI (11)	-	-
	Q136K+D151N+H275Y	HRI (356)	NI (4)	HRI (2300)	-
	223V+N295S+H275Y	HRI (300)	RI (13)	-	-
A(H5N1)	V96A	RI (11-18)	RI (10-63)	NI (4)	-
	I97V	NI (5)	NI (4)	-	-
	E99A	RI (35)	HRI (1254)	-	-
	E99G	NI (3-4)	HRI (1345-1485)	-	-
	Q116L	RI (26)	HRI (350)	-	-
	V129A	NI (4)	NI (8)	-	-
	D179G	RI (32)	RI (44)	NI (4)	-
	I203M	RI (36)	NI (1)	NI (1)	-
	I203V	NI (7)	NI (1)	NI (1)	-
	S227N	RI (24)	NI (2)	-	-
	H255Y	HRI (911-2502)	NI (1-3)	HRI (108-533)	NI (6)
	N275S	RI/HRI (12-138)	NI/RI (2-27)	NI/RI/HRI (3-130)	-
	I97V+I294V	RI (16)	NI (1)	NI (1)	-
	I203M+H255Y	HRI (8024)	NI (3)	HRI (3340)	-
	I203V+H255Y	HRI (1925)	NI (2)	HRI (2106)	-
	K130N+I203L+S227N	RI (77)	NI (1)	-	-
A(H3N2)	E119D	NI (2)	RI (32)	NI (2)	-
	E119I	HRI (208)	RI (17)	NI (3)	-
	E119V	RI/HRI (18-2057)	NI (1-7)	NI (1-3)	NI (3-4)

	Q136K	NI (1-7)	RI/HRI (30-132)	-	-
	D151E	RI (11)	NI (2)	-	-
	D151V/D	NI (8)	HRI (164)	-	-
	I222L	NI (9)	NI (2)	-	-
	R224K	HRI (>4000)	RI (>50)	-	-
	Del 245-248	HRI (157-175)	NI (3)	NI (1)	-
	E276D	RI (15)	HRI (160)	-	-
	R292K	HRI (>10000)	NI/RI/HRI (3-134)	RI/HRI (14-719)	-
	N294S	HRI (300-1879)	NI (8)	NI (1)	-
	R371K	RI (45)	RI (15)	-	-
	E119V+T148I	HRI (>6000)	HRI (>800)	HRI (>110)	HRI (>250)
	E119V+I222L	HRI (1571)	RI (5)	-	-
	E119V+I222V	HRI (293-2286)	NI (2)	NI (7)	-
A(H3nN2)v	S245N	NI (1)	NI (1)	NI (1)	NI (1)
	S247P	RI (42)	HRI (266)	NI (2)	NI (2)
	S245N+S247P	RI (25-40)	HI/HRI (66-235)	NI (1-2)	NI (7-9)
A(H7N9)	R289K	HRI (>4600)	RI (11-64)	HRI (405-997)	RI (15-33)

Anexo 02 – Origem das cepas de FluAV, identificadas com marcadores associados a RdS aos NAIs



Figura 9.1 - Origem das cepas de FluV, identificadas através do sequenciamento genético, carregando marcadores associados a RdS aos NAIs.

O esquema acima apresenta a origem das cepas identificadas carregando mutação associadas a RdS ao NAIs, nas regiões brasileiras cobertas pelo LVRS, durante os anos de 2017, 2018 e 2019. O quadro no canto inferior esquerda, apresenta a legenda com o símbolo e mutação relacionado a cada cepa.

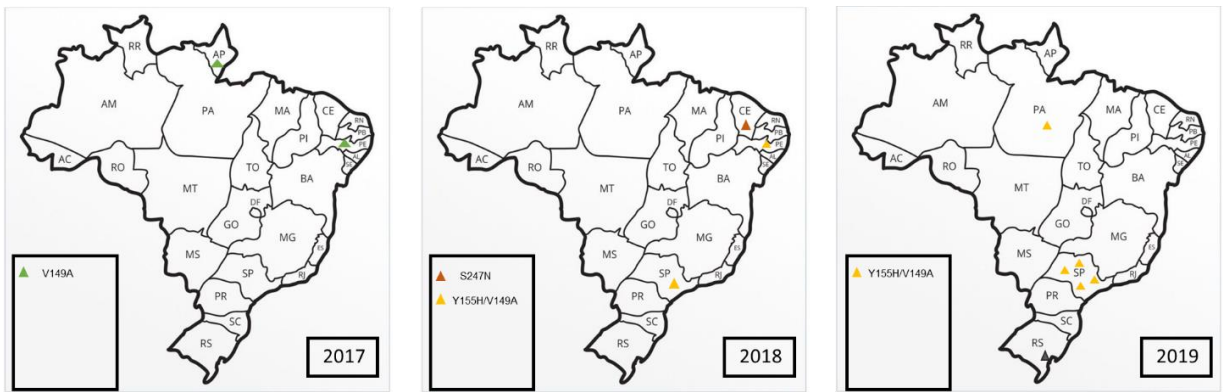
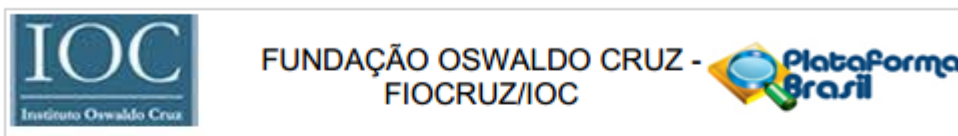


Figura 9.2 - Origem de cepas de FluAV, carreando mutações associadas com RdS aos NAIs, circulantes em outras regiões do Brasil, identificadas através do banco de dados público GISAID

O esquema acima apresenta a origem das cepas identificadas carreando mutação associadas a RdS ao NAIs, nas outras regiões brasileiras, durante os anos de 2017, 2018 e 2019. O quadro no canto inferior esquerda, apresenta a legenda com o símbolo e mutação relacionado a cada cepa.

Anexo 03 - Comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo

Pesquisador: Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 68118417.6.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
CNPQ
Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.453.470

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo observacional a ser desenvolvido no Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (LVRS) do IOC, Laboratório de Referência Nacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde para Influenza e Vírus Exantemáticos e Regional da América Latina para a OMS utilizará amostras provenientes da rede de vigilância epidemiológica para os vírus respiratórios e exantemáticos. Serão realizados estudos sobre a circulação dos vírus no Brasil, a patogênese e resposta imune frente às infecções, através de análises de amostras respiratórias, de soro ou de urina provenientes da rede de vigilância de vírus respiratórios e exantemáticos recebidas pelo LVRS em fluxo contínuo ao longo do ano. As mostras de soro e urina da rede de vigilância de vírus exantemáticos serão utilizadas para ensaios sorológicos para sarampo, rubéola, caxumba e varicela. Serão utilizados também dados da ficha Sivep Gripe ou SRAG do Ministério da Saúde.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo busca estudar fatores virais e de resposta imune de vírus respiratórios e exantemáticos em amostras provenientes da rede de vigilância de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), Síndrome Gripal (SG) e doenças exantemáticas recebidas pelo Laboratório de Vírus Respiratórios e

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.453.470

Sarampo (LVRS) do IOC/Fiocruz. Para este fim os autores pretendem estudar amostras clínicas de pacientes enviadas ao LVRS através do sistema de vigilância SRAG universal e sentinela do Ministério da Saúde para vírus respiratórios e exantemáticos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios diretos e indiretos são avaliados no projeto e trazidos nos TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto suficientemente claro, bem fundamentado, sem necessidade de ser encaminhado para a CONEP. O estudo proposto parece pertinente e possui valor científico. A Metodologia é adequada e permitirá atingir o objetivo primário.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados e avaliados os seguintes documentos:

Carta resposta ao CEP assinada pela pesquisadora responsável, datada em 22/11/17 indicando ter atendido a todas as pendências inclusive traduzido o CV.

Informações básicas do projeto

Termos de assentimento Livre e Esclarecido (TALE), versões 3.0 de 28/11/2017, em papel com logotipo da instituição, redigido em terceira pessoa.

Curriculum vitae (CV) de Aline da Rocha Matos

Cronograma. Indica que coleta de dados terá início em janeiro 2018.

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No conjunto o estudo parece adequado metodologicamente, e considera-se eticamente aceitável e em conformidade com a Resolução 466/2012 e Norma Operacional 01/2013 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

1. Projeto:

b. Esclarecer como serão tratados os dados de identificação dos pacientes contidos nas fichas do SIVEP. Sugere-se que sejam apagados ou cobertos nomes, endereço e telefone destas fichas.

Esclarecido sobre os cuidados e tratamento dos dados sigilosos das fichas.

Pendência atendida.

TCLEs e TALEs.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.453.470

2. No entanto deve explicar em linguagem adequada ao público alvo o texto adicionado, especialmente as "questões éticas da participação na pesquisa". Os pesquisadores explicaram e exemplificaram as questões éticas da participação na pesquisa.

Pendência atendida.

3. A assinatura do responsável deve ser retirada dos TALEs, somente precisa constar no TCLE para responsáveis e substituir a palavra "cópia" por "documento/folhas iguais". Lembrar que criança pequena pode não saber assinar, inserir local para colocar a digital, o mesmo caso se a população alvo inclui analfabetos.

Feitas as supressões e inserções requeridas.

Pendência atendida

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 234ª Reunião Ordinária, realizada em 12.12.2017, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_823022.pdf	30/11/2017 11:33:26		Aceito
Outros	TCLE_TALE_marcados_nov_17.pdf	30/11/2017 11:31:37	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Cronograma	cronogramaNov17.pdf	30/11/2017 11:31:04	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta_22_11_17.pdf	30/11/2017 11:30:22	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TALE_nov_17.pdf	30/11/2017 00:28:10	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamentos_LVRS_completo_atual_Set_17.pdf	05/09/2017 10:00:30	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Orçamento	orcamento_detalhado.pdf	05/09/2017 10:00:15	Marilda Agudo Mendonça Teixeira	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.453.470

Orçamento	orcamento_detalhado.pdf	05/09/2017 10:00:15	de Siqueira	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCEPLVRSsetembro17sem_marcacao.pdf	05/09/2017 09:53:03	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPLVRSsetembro17.pdf	04/09/2017 18:41:12	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_Sigilo_LVRS_assinado.pdf	03/05/2017 21:00:30	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regimento_Biorrepositorio_LVRS_assinado.pdf	03/05/2017 20:56:44	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_assinada.pdf	03/05/2017 20:53:49	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_LVRS.pdf	03/05/2017 20:51:36	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 21 de Dezembro de 2017

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br