

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**ANÁLISE DA REATIVIDADE CONTRA AS PROTEÍNAS H1 E H3 DOS VÍRUS
INFLUENZA AMÉRICA DO SUL POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO**

por

ANDREZA PARREIRAS GONÇALVES

Belo Horizonte

2020

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

A. P. GONÇALVES

2020

ANDREZA PARREIRAS GONÇALVES

**ANÁLISE DA REATIVIDADE CONTRA AS PROTEÍNAS H1 E H3 DOS VÍRUS
INFLUENZA AMÉRICA DO SUL POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dr. Pedro Augusto Alves

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Belo Horizonte

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

G635a Gonçalves, Andreza Parreiras.
2020

Análise da reatividade contra as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza América do Sul por ensaio imunoenzimático / Andreza Parreiras Gonçalves. - Belo Horizonte, 2020.

76 f. : il. color.

Orientadores: Pedro Augusto Alves e Andréa Teixeira de Carvalho.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2020.

Bibliografia: f. 71 - 76.

1. Influenza Humana/diagnóstico. 2. Estudos Soroepidemiológicos. 3. Técnicas Imunoenzimáticas/métodos. 4. Saúde do Adolescente/tendências. I. Título.

CDD 616.2406

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

Andreza Parreiras Gonçalves

**ANÁLISE DA REATIVIDADE CONTRA AS PROTEÍNAS H1 E H3 DOS VÍRUS
INFLUENZA AMÉRICA DO SUL POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Banca Examinadora:

Dr. Pedro Augusto Alves (IRR – FIOCRUZ MINAS) Presidente

Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR – FIOCRUZ MINAS) Presidente

Dr^a. Jacqueline Araújo Fiúza (IRR – FIOCRUZ MINAS) Titular

Dr^a. Ana Paula Moreira Franco Luiz (UFMG) Titular

Dr^a. Eneida Santos de Oliveira (IRR – FIOCRUZ MINAS) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 17/02/2020

COLABORADORES:

Dra. Beatriz D'Agord Schaan - UFRGS

Dr. Felipe Vogt Cureau – UFRGS

Dra. Pâmela Ferreira Todendi – UFRGS

Dra. Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado – UFRGS

Dr. Moyses Szklo – UFRJ

Dr. Olindo Assis Martins Filho – IRR/Fiocruz Minas

Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado – IRR/Fiocruz Minas

Dr. Jerônimo Conceição Ruiz – IRR/Fiocruz Minas

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo – IRR/Fiocruz Minas

Dr. Sarah Giarola da Silva – IRR/Fiocruz Minas

Lorena Júnia de Souza Santos – IRR/Fiocruz Minas

Dr. Sabrynna Brito Oliveira – UFMG

INSTITUIÇÕES PARCEIRAS:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (RJ)

SUPORTE FINANCEIRO:

DECIT/FINEP/CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES)

Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me guiado, sustentado e capacitado ao longo dessa trajetória, me fazendo lembrar todo o tempo que em tudo Ele é bom.

Ao Dr. Pedro Alves e Dra. Andréa Teixeira, meus orientadores. Primeiramente, agradeço por terem acreditado e depositado em mim a confiança que me permitiu chegar até aqui. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, pelo apoio, incentivo, paciência e dedicação, que foram fundamentais para minha formação científica, profissional e pessoal. Muito obrigada por compartilharem comigo suas experiências, conhecimentos e visões. A contribuição de vocês fez toda a diferença para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento.

À Lorena Santos e a Sabrynna Oliveira, que contribuíram imensamente para a execução desse projeto, e me proporcionaram momentos de trabalho muito mais agradáveis e divertidos!

À todos os amigos do Grupo Imunologia de Doenças Virais e Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, pelo acolhimento e incentivo, e por todos os momentos de descontração, aprendizado e companheirismo.

Aos colegas do mestrado, que trilharam parte dessa trajetória comigo, sempre com muito bom humor e leveza, fazendo com que essa etapa fosse mais prazerosa.

Ao Instituto René Rachou, professores e funcionários do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, por fazerem parte da minha formação pessoal e profissional.

Aos órgãos e instituições de fomento, em especial a CAPES e ao CNPq, pela concessão das bolsas e apoio financeiro, que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho e minha formação profissional.

À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

À todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, impulsionando, direcionando meus passos e torcendo por mim. Por todo apoio e carinho ao longo desses anos, sou imensamente e eternamente grata.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, e que torceram por mim. Muito obrigada!

RESUMO

A influenza é uma doença infecciosa respiratória aguda, causada pelos vírus influenza, que possui distribuição global e transmissibilidade elevada, sendo considerada a infecção viral de maior impacto no mundo. Entretanto, ainda é difícil quantificar a real incidência/prevalência dessa doença, uma vez que grande parte dos indivíduos infectados não procura atendimento médico, e, portanto, não é diagnosticada. Nesse contexto, a determinação direta da soroprevalência contra influenza pode gerar informações mais exatas sobre a doença. Os ensaios imunoenzimáticos permitem a detecção de anticorpos contra influenza e podem assim ser usados para estimar soroprevalência desses vírus em determinadas populações. Crianças e adolescentes representam importantes grupos de risco de infecção por influenza, por estarem mais expostos ao contato com esses vírus no ambiente escolar. Portanto, a avaliação de biomarcadores de infecções prévias por tais vírus nesses indivíduos configura uma boa oportunidade de se estimar o perfil de reatividade dessa população. Esse trabalho avaliou a reatividade do soro de adolescentes escolares residentes no Rio Grande do Sul, contra as proteínas H1 e H3 do influenza. Para isso, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático indireto, utilizando como antígenos as proteínas H1 e H3. As proteínas usadas foram produzidas por expressão em sistema *E. coli*, por meio do uso de vetores pET30a, nos quais foram subclonadas sequências gênicas de H1 e H3, geradas a partir de sequências consenso, montadas através do alinhamento de sequências de diferentes amostras virais de (H1N1)pdm e H3N2. A partir do ensaio imunoenzimático desenvolvido, 957 amostras de soro de adolescentes, entre 12 e 17 anos, que frequentavam escolas na cidade de Porto Alegre no Rio Grande do Sul foram testadas quanto à presença de anticorpos IgG contra as proteínas H1 e H3. Os resultados obtidos demonstraram que grande parte dessa população possui anticorpos contra os subtipos de influenza A, (H1N1)pdm09 e H3N2. Foi observada uma taxa de soropositividade geral entre os adolescentes de 78,47% para a proteína H1 e 80,67% para a proteína H3. As taxas elevadas de soropositividade observadas corroboram com dados publicados por outros países, nos quais também foram encontrados níveis de soropositividade para influenza entre 80 e 100% em populações jovens. A soropositividade elevada encontrada entre os escolares desse estudo sugere que essa população pode estar mais exposta às infecções por esses vírus e alerta sobre as consequências potenciais dessas infecções. Futuramente, as informações geradas por esse estudo poderão auxiliar na tomada de decisões de saúde pública para a implementação de estratégias de controle e prevenção da influenza na região sul do Brasil.

Palavras-chave: influenza, ensaio imunoenzimático, soropositividade, adolescentes.

ABSTRACT

Influenza is an acute respiratory infectious disease, caused by influenza viruses, which has a global distribution and high transmissibility, considered the viral infection with the highest burden worldwide. However, it is still difficult to quantify the real incidence/prevalence of this disease, since most of the infected individuals do not seek medical attention, and, therefore, are not diagnosed. Thus, the direct determination of seroprevalence against influenza virus can provide more accurate data about this infection. Immunoenzymatic assays allow the detection of antibodies against influenza virus and can be used to estimate the seroprevalence of these viruses in specific populations. Children and adolescents represent important risk groups for influenza infection, as they are more exposed to contact with these viruses in the school environment. Therefore, the evaluation of biomarkers of previous infections by such viruses in these individuals represents a great opportunity to estimate the reactivity profile of this population. The current study evaluated the serum reactivity of adolescent students residing in Rio Grande do Sul, against H1 and H3 influenza virus proteins. For this purpose, an indirect enzyme immunoassay was developed, using H1 and H3 proteins as antigens. The proteins used were produced by expression in *E. coli* system, using pET30a vectors, in which H1 and H3 gene sequences were subcloned. Such sequences were generated from consensus sequences, assembled by the alignment of sequences from different viral samples of (H1N1)pdm09 and H3N2 influenza viruses. After the establishment of the immunoenzymatic assay, 957 serum samples from adolescents, with age ranging from 12 to 17 years old, who attended schools in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul state were tested for the presence of IgG antibodies against H1 and H3 proteins. The data revealed that a large proportion of the study population had antibodies against both influenza A subtypes, (H1N1)pdm09 and H3N2. An overall seropositivity rate of 78.47% for protein H1 and 80.67% for protein H3 was found among the adolescents, corroborating with previous studies in other countries, in which levels of seropositivity between 80 and 100% were also found in young populations. The high seropositivity found among the adolescent students draws attention to the fact that this population might be more exposed to infections by such viruses and alert for the potential consequences of these infections. Taken together, the information generated by this study can assist the public managers in decision making for the implementation of influenza control and prevention strategies in the southern region of Brazil.

Keywords: influenza, immunoenzymatic assay, seropositivity, adolescents.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	- Graus Centígrados.
µL	- Microlitros.
Anti-his	- Anticorpos anti-histidina.
ASC	- Área sob a curva.
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil.
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention.</i>
CNPq	- Centro Nacional de Pesquisa.
DO	- Densidade ótica.
DO _f	- Densidade ótica final.
ELISA	- Enzimaimunoensaio.
ERICA	- Estudo de Risco Cardiovascular em Adolescentes.
GISRS	- Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe.
HA	- Hemaglutinina.
ICTV	- <i>International Committee on Taxonomy of Viruses.</i>
IgG	- Imunoglobulina de classe G.
IL-1β	- Interleucina 1 Beta.
IL-6	- Interleucina 6.
IPTG	- Indutor de galactosidase.
IRR	- Instituto René Rachou.
ITRI	- Infecção do trato respiratório inferior.
ITRS	- Infecção do trato respiratório superior.
M2	- Proteínas transmembrana de canal iônico M2.
mL	- Mililitros.
mM	- Milimolar.
N	- Normal.
NA	- Neuraminidase.
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information.</i>
Ng	- Nanogramas.
Nm	- Nanômetros.
NOD	- Domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo.
NP	- Nucleoproteína.
NS1	- Proteína não-estrutural NS1.
NS2	- Proteína não-estrutural NS2.

p	- Coeficiente de correlação computacional.
PA	- Polimerase PA.
PB1	- Polimerase PB1.
PB2	- Polimerase PB2.
PBS	- Tampão fosfato-salino.
PBST	- PBS 1X acrescido de 0,05% de Tween 20.
PBST3%BSA-	PBST acrescido de 3% de albumina bovina.
pH	- Potencial hidrogênico.
r	- Índice de correlação.
RIG-I	- Genes indutores de ácido retinóico.
RNA	- Ácido ribonucleico.
RNP	- Complexo ribonucleoproteico.
ROC	- <i>Receiver operating characteristic</i> .
Rpm	- Rotação por minuto.
SDS-PAGE	- Dodecilsulfato de sódio.
SES-RS	- Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul.
SRAG	- Síndrome respiratória aguda grave.
TNF- α	- Fatores de Necrose Tumoral Alfa.
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais.
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
UFRJ	- Universidade Federal do Rio de Janeiro.
WHO	- <i>World Health Organization</i> .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variedade de hospedeiros e reservatórios dos diferentes tipos de influenza.....	15
Figura 2 - Linha temporal das pandemias de influenza.....	17
Figura 3 - Distribuição atual dos subtipos virais de influenza e porcentagem de amostras positivas por área de transmissão.....	18
Figura 4 - Circulação global dos vírus influenza.....	18
Figura 5 - Distribuição dos subtipos de influenza por zona de transmissão.....	20
Figura 6 - Casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e óbitos confirmados por influenza, e percentual dos subtipos identificados por região brasileira entre 2013 e 2014.....	21
Figura 7 - Casos de influenza segundo regional de residência no Rio Grande do Sul 2013- 2014.....	22
Figura 8 - Representação esquemática da partícula viral dos vírus influenza do tipo A.....	24
Figura 9 - Desenho esquemático dos mecanismos de drift e shift antigênicos do influenza.....	25
Figura 10 - Desenho esquemático da estrutura e localização da HA na partícula viral.....	27
Figura 11 - Curso da resposta imune e sintomatologia na infecção pelo vírus influenza.....	30
Figura 12 - Ciclo de multiplicação do influenza e atuação da imunidade adaptativa na infecção.....	31
Figura 13 - Construtos pET30a com as sequências das proteínas H1 e H3	44
Figura 14 - Parte do alinhamento e sequência consenso de H1	50
Figura 15 - Parte do alinhamento e sequência consenso de H3	51
Figura 16 - Sequência gênica de H1	52
Figura 17 - Sequência gênica de H3	53
Figura 18 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His, da expressão da proteína recombinante H1	54
Figura 19 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His, da purificação da proteína recombinante H1.....	55

Figura 20 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His, da expressão da proteína recombinante H3	56
Figura 21 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His da purificação da proteína recombinante H3.....	56
Figura 22 - Obtenção do ponto de corte para os ensaios de ELISA e resultados do perfil de reatividade para a proteína H1	59
Figura 23 - Obtenção do ponto de corte para os ensaios de ELISA e resultados do perfil de reatividade para a proteína H3.....	60
Figura 24 - Gráficos de dispersão demonstrando a distribuição dos valores de DOf da população do estudo para H1 e H3, de acordo com os valores de mediana e tercis globais	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Influenza	15
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 Os vírus influenza	23
1.1.3 Genoma e estrutura viral	24
1.1.4 Proteínas de superfície.....	26
1.1.5 Hemaglutinina.....	27
1.1.6 Imunidade desencadeada contra o influenza	29
1.1.7 Manifestações clínicas e patogênese.....	31
1.1.8 Importância dos estudos soroepidemiológicos em influenza	33
1.2 Coorte de Estudos de Risco Cardiovascular em Adolescentes – ERICA.	36
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 População do estudo.....	40
4.1.1 Questões éticas.....	41
4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes H1 e H3.....	41
4.2.1 Seleção das sequências de H1 e H3 e síntese gênica	42
4.2.2 Subclonagem dos genes de H1 e H3 em vetores pET30a	43
4.2.3 Expressão e purificação das proteínas H1 e H3.....	44
4.2.4 Solubilização das proteínas H1 e H3.....	45
4.3 Confirmação do perfil de reatividade do grupo controle por ensaio de Inibição da Hemaglutinação	45

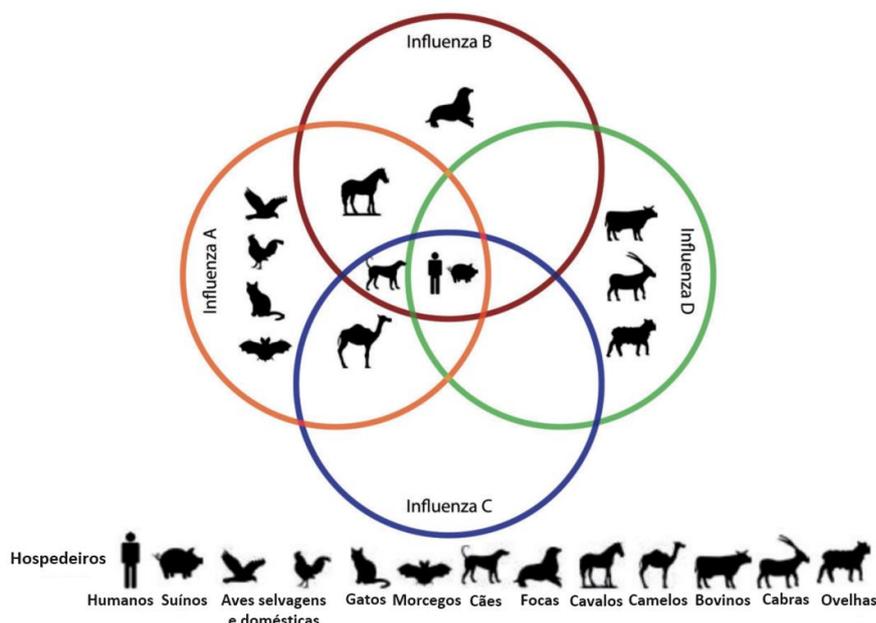
4.4 Ensaio imunoenzimático para avaliação da reatividade contra H1 e H3 ..	46
4.4.1 Avaliação do perfil de reatividade da população do estudo contra H1 e H3	47
4.5 Análise dos resultados de reatividade.....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes H1 e H3	49
5.1.1 Seleção das sequências de H1 e H3, síntese gênica e subclonagem dos genes em vetores pET30a	49
5.1.2 Expressão, purificação e solubilização das proteínas H1 e H3	54
5.1.2.1 Expressão, purificação e solubilização da proteína H1	54
5.1.2.2 Expressão, purificação e solubilização da proteína H3	55
5.2 Ensaio imunoenzimático para avaliação da reatividade contra H1 e H3 ..	57
5.2.1 Estabelecimento do ensaio imunoenzimático para avaliação da reatividade contra H1 e H3	57
5.2.2 Análise dos resultados do perfil de reatividade da população do estudo contra H1 e H3	58
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	69
8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Influenza

A influenza, popularmente conhecida como gripe, é uma doença aguda infecciosa de alta transmissibilidade, causada pelos vírus influenza, considerada a infecção viral de maior impacto no mundo atual (WHO, 2018; CASSINI et al, 2018). Esses vírus são caracterizados por variabilidades antigênica e genética elevadas, e grande capacidade de infectarem diferentes organismos, como os seres humanos, animais domésticos e selvagens (Figura 1). Essas características do influenza permitem que haja transmissão de tais vírus entre diferentes hospedeiros, o que aumenta sua transmissibilidade e contribui para que permaneçam em circulação em ambientes diversos (PAULES; SUBBARAO, 2017).

Figura 1 - Variedade de hospedeiros e reservatórios dos diferentes tipos de influenza.



Desenho esquemático representando a grande diversidade de hospedeiros e reservatórios descritos para os vírus influenza, divididos por tipo viral. Fonte: Adaptado BAILEY, 2018.

Em seres humanos a gripe é causada principalmente pelos vírus influenza dos tipos A e B, que atingem o trato respiratório causando doença de gravidade variável (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016). O quadro sintomático dessa doença é caracterizado pelo aparecimento súbito de febre, sintomas respiratórios, dores de

cabeça, dores musculares e mal-estar geral, e este quadro pode perdurar por até duas semanas. Grande parte das pessoas se recupera sem necessitar de atenção médica, porém, desfechos mais graves podem ocorrer, levando a complicações, hospitalização e até mesmo à morte. Com isso, epidemias causadas por esses vírus comumente resultam em níveis altos de absentismo entre trabalhadores e escolares, grandes perdas de produtividade e sobrecarga dos setores de saúde (WHO, 2018).

1.1.1 Epidemiologia

Há anualmente a circulação global de vírus influenza, principalmente na forma de surtos locais e epidemias sazonais. Essa circulação se dá, principalmente, devido à maior facilidade de transmissão desses vírus durante estações frias, em decorrência das baixas condições de umidade e temperatura e a maior tendência de indivíduos permanecerem em locais pouco arejados durante esses períodos. Em regiões com estações climáticas menos definidas, como regiões tropicais, esses vírus podem circular de maneira menos uniforme durante o ano, mas o número de casos tende a se acumular durante períodos mais frios (WHO, 2018; BRASIL, 2019a).

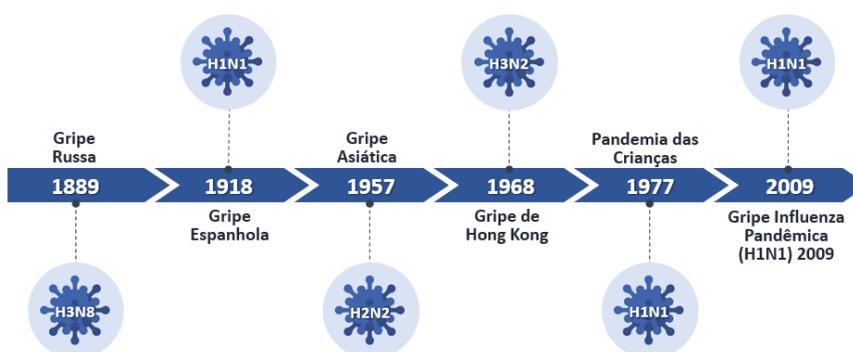
É estimado que os vírus influenza estejam em circulação há séculos na população humana, causando epidemias e pandemias desde 1889. Eles infectam anualmente entre 5% e 10% da população global, com maior incidência em crianças, podendo chegar a 30% e, de acordo com essa estimativa, todos os indivíduos ao completarem 4 anos de idade terão sido expostos ao vírus influenza ao menos uma vez ao longo da vida (FRANCIS; KING; KELVIN, 2019).

A transmissão sazonal do vírus influenza causa grande impacto na saúde humana global, atingindo milhões de indivíduos e causando entre 3 a 5 milhões de casos graves de doença e de 291 a 650 mil mortes anualmente (IULIANO et al, 2018; WHO, 2018). Além disso, pandemias esporádicas de influenza do tipo A podem ocorrer, geralmente quando há introdução de novas amostras na população, sendo responsáveis por causarem impacto ainda maior na saúde e economia global (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; FRANCIS; KING; KELVIN, 2019).

Ao longo do tempo foi observado que novas pandemias de influenza ocorrem entre períodos de 10 a 50 anos, e nos últimos 150 anos foram registradas ao menos

seis pandemias (KRAMMER et al, 2018; FRANCIS; KING; KELVIN, 2019; WHO, 2005). A primeira delas ocorreu em 1889, causada por um vírus do subtipo H3N8 e ficou conhecida como Gripe Russa. Alguns anos depois, em 1918, houve a pandemia conhecida como Gripe Espanhola, causada por um vírus H1N1, e estima-se que este tenha infectado um terço da população mundial causando cerca de 50 milhões mortes, sendo essa a maior pandemia de influenza registrada até os dias atuais (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; BRASIL, 2019a). Em 1957 houve a introdução de uma nova amostra de H2N2, o que resultou na pandemia conhecida como Gripe Asiática, responsável pela morte de cerca de 2 milhões de indivíduos. Em seguida, em 1968, outra amostra viral, H3N2, de origem suína, foi introduzida na população mundial, causando a Gripe de Hong Kong, e esse subtipo viral permanece em circulação até hoje. Em 1977 houve uma reintrodução de vírus H1N1 na população mundial, dando origem a pandemia conhecida como Pandemia das Crianças, e em 2009 esse subtipo viral reemergiu com uma nova amostra que causou a Gripe Influenza Pandêmica (H1N1) 2009, responsável pela morte de ao menos 280 mil pessoas (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; FRANCIS; KING; KELVIN, 2019; KRAMMER et al, 2018). Uma linha do tempo, com as pandemias registradas desde 1889, está representada na Figura 2.

Figura 2 - Linha temporal das pandemias de influenza

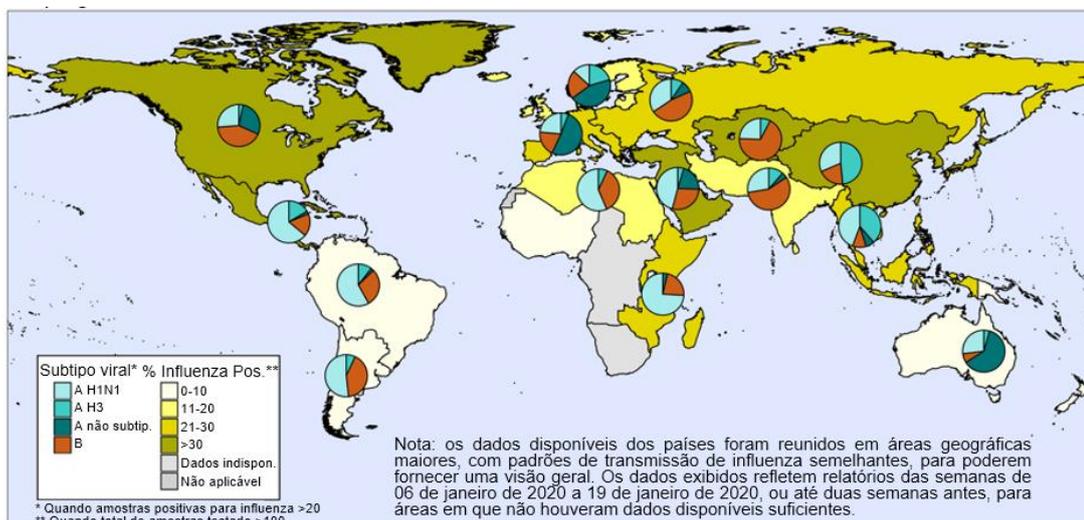


A linha do tempo representada ilustra as seis pandemias causadas pelos vírus influenza A que foram registradas nos últimos 140 anos, de 1889 a 2009 (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; FRANCIS; KING; KELVIN, 2019; KRAMMER et al, 2018; BRASIL, 2019a). Fonte: imagem elaborada pela autora.

Desde a pandemia de 2009, co-circulam mundialmente de maneira sazonal os vírus influenza do tipo A (H1N1)pdm09 e H3N2, e duas linhagens de influenza do tipo B, Victoria e Yamagata. Esses vírus estão amplamente distribuídos pelo mundo e seus

períodos de maior circulação variam de acordo com as estações climáticas (WHO, 2018). A distribuição atual desses vírus está representada na Figura 3.

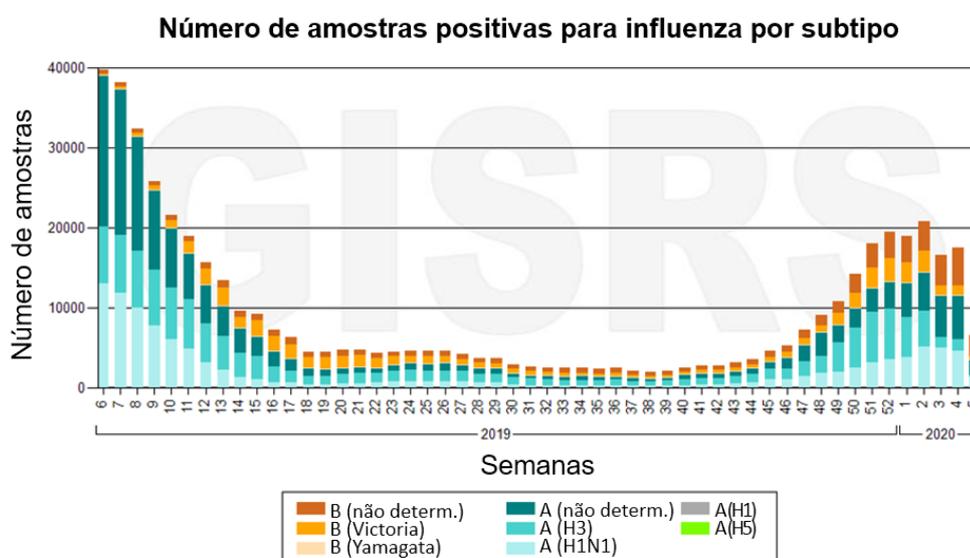
Figura 3 - Distribuição atual dos subtipos virais de influenza e porcentagem de amostras positivas por área de transmissão



Mapa mundial mostrando a distribuição dos subtipos virais de influenza e a porcentagem de amostras respiratórias que foram positivas para esses vírus, durante o período de 06 a 19 de janeiro de 2020, dividido por área de transmissão. Fonte: adaptado de WHO, 2020a.

Entre 2019 e 2020, um levantamento feito pelo Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe (GISRS) revelou que a maioria dos casos de influenza notificados nesse período foram causados por vírus do tipo A (WHO, 2020b) (Figura 4).

Figura 4 - Circulação global dos vírus influenza.



Número de amostras positivas para influenza, divididas por subtipo. Dados obtidos entre a semana epidemiológica 6 de 2019 e a semana epidemiológica 5 de 2020. Fonte: Adaptado de WHO, 2020b.

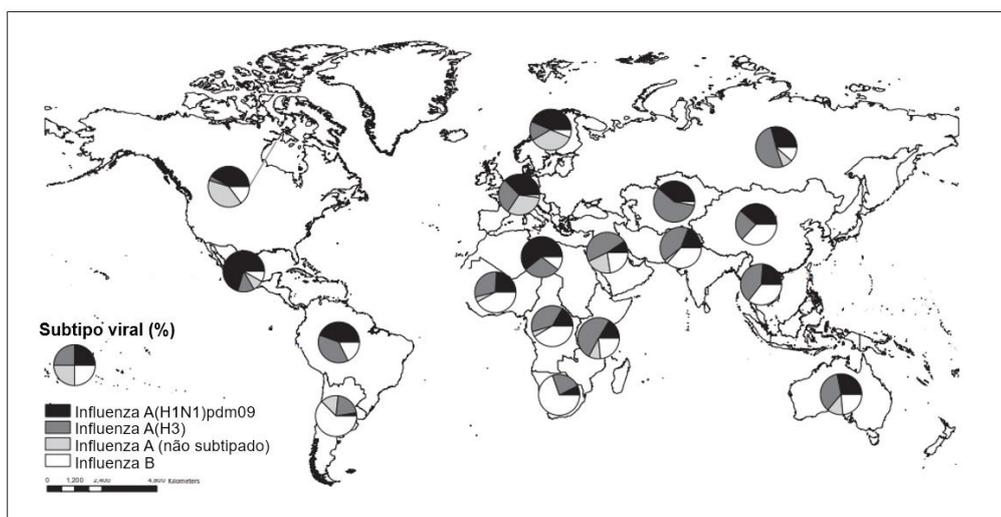
Os vírus do tipo B também permanecem em circulação e sua distribuição não é heterogênea em todo planeta. Em algumas regiões, há maior incidência de infecções causadas pelos vírus desse tipo e esses padrões de circulação podem variar ao longo do tempo. Essa variação, juntamente com a grande variabilidade antigênica dos vírus influenza, justificam a necessidade de haver um monitoramento epidemiológico preciso, global e constante desses vírus, e isso em geral é feito pelos Centros Nacionais de Influenza, que são unidades parceiras da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019). Anualmente é feito o monitoramento das amostras circulantes de influenza no mundo, e isso permite a reformulação de vacinas de acordo com o subtipo circulante em maior proporção e a inferência dos vírus a serem introduzidos na população. Esse monitoramento é fundamental para garantir que estratégias de controle e prevenção sejam eficazes e estejam atualizadas (WHO, 2018).

No Brasil, o perfil de circulação dos vírus influenza é similar ao mundial, havendo, atualmente, predomínio dos vírus do tipo A e circulação menos expressiva dos influenza do tipo B (BRASIL, 2019b). Porém, esse padrão varia e, em geral, é observado que locais intensamente atingidos por um subtipo viral durante um ano apresentam circulação menor desses vírus no ano seguinte, o que pode ser explicado pela resposta imune induzida em parte da população, tanto pela infecção natural quanto pela vacinação, que fazem com que o número de indivíduos suscetíveis diminua, favorecendo a circulação de outros vírus (BRASIL, 2019a).

No ano de 2019, das notificações de síndromes gripais e síndromes respiratórias graves, registradas no Brasil por influenza, 51% dos casos foram causados por vírus influenza A (H1N1)pdm09, 16% por influenza A H3N2 e 22% por influenza do tipo B. Foram notificados naquele ano 2.365 casos de síndrome gripal por influenza e 5.714 casos de síndrome respiratória grave, resultando em ao menos 1.109 óbitos em todo o país (BRASIL, 2019b). Entretanto, esses dados referem-se apenas a casos em que houve complicações respiratórias e no qual o indivíduo buscou atendimento médico. Quando somamos a estes, casos de complicações não respiratórias, infecções assintomáticas e casos nos quais o indivíduo não buscou atendimento nos setores de saúde, os números tendem a informar proporções ainda maiores (REDLBERGER-FRITZ et al, 2012; GREEN et al, 2013).

Entre os anos de 2013 e 2014, período em que foram feitas as coletas das amostras da população de estudo deste trabalho, foi registrada mundialmente a co-circulação dos vírus influenza dos tipos A e B, com predomínio na circulação de influenza A no hemisfério norte e de influenza B no hemisfério sul. A América do Sul acompanhou a tendência mundial, com circulação dos dois tipos virais e predomínio na circulação dos vírus influenza A(H1N1)pdm09 (Figura 5).

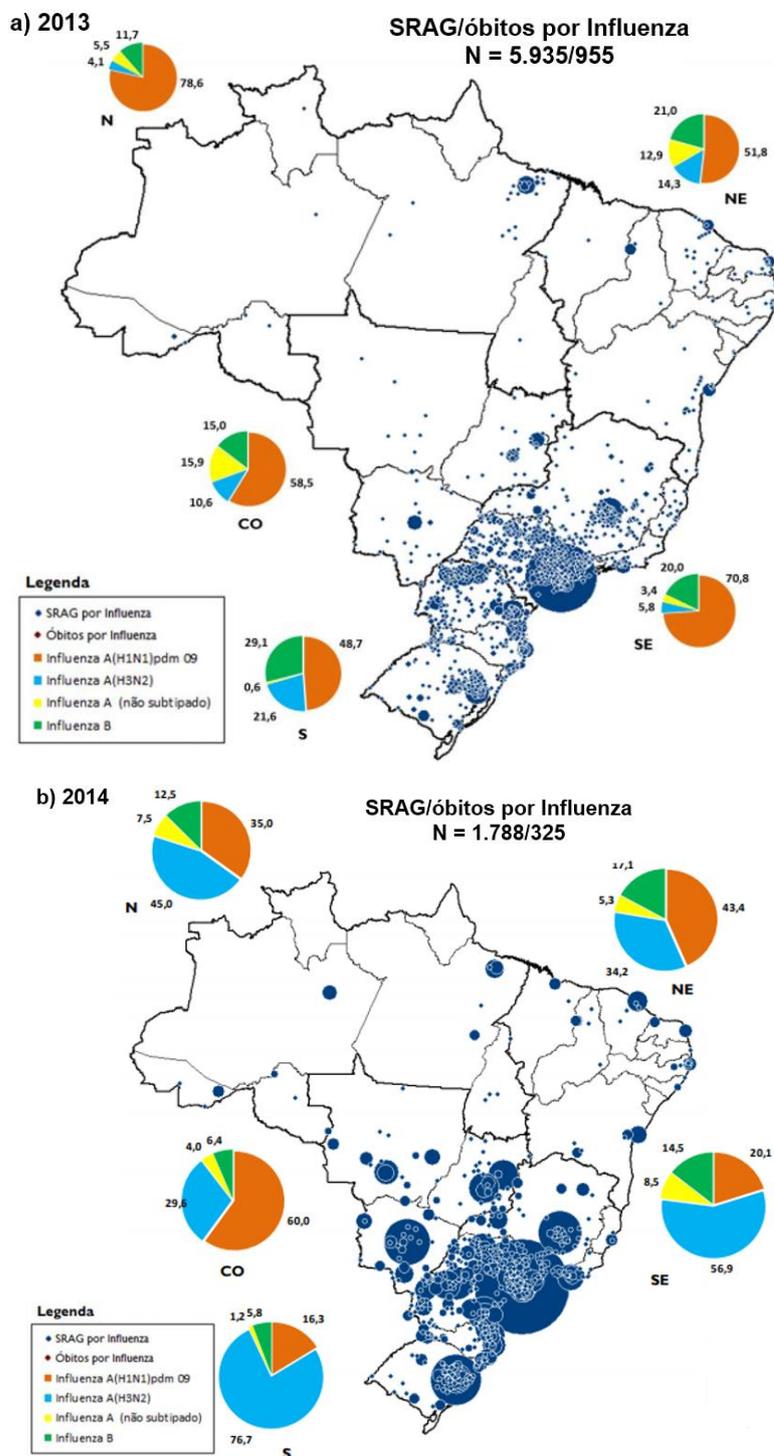
Figura 5 - Distribuição dos subtipos de influenza por zona de transmissão



Perfil de distribuição dos vírus influenza circulantes mundialmente, divididos por subtipo viral. Dados obtidos entre setembro de 2013 a maio de 2014. Fonte: WHO, 2014.

No Brasil, entre 2013 e 2014, foram confirmados 7.723 casos de influenza, que resultaram em 1.280 óbitos. Houve predomínio na circulação dos vírus influenza A (H1N1)pdm09 no ano de 2013 e A H3N2 em 2014, sendo as regiões sul e sudeste do país as mais afetadas por esses vírus (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015) (Figura 6).

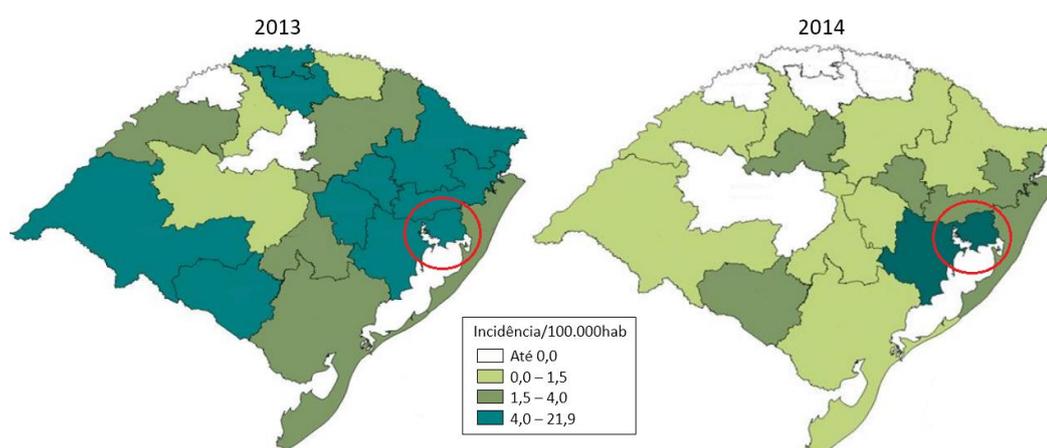
Figura 6 - Casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e óbitos confirmados por influenza, e percentual dos subtipos identificados por região brasileira entre 2013 e 2014



(a) Distribuição espacial e número de casos de SRAG e óbitos em decorrência de infecção pelos vírus influenza no Brasil em 2013, e percentual de cada subtipo viral circulante nas regiões do país. (b) Distribuição espacial e número de casos de SRAG e óbitos em decorrência de infecção pelos vírus influenza no Brasil em 2014, e percentual de cada subtipo viral circulante nas regiões do país. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014; BRASIL, 2015.

Especificamente no estado do Rio Grande do Sul, local onde foram coletadas as amostras desse estudo, houve entre os anos de 2013 e 2014 a co-circulação dos vírus influenza A (H1N1)pdm09 e H3N2, além de influenza do tipo B. Em 2013 houve maior incidência de casos de influenza, com predomínio do vírus (H1N1)pdm09, sendo registrados 323 casos para esses vírus e 157 para H3N2. Por outro lado, no ano de 2014, houve menor incidência de influenza, sendo observado predomínio nas infecções causadas por H3N2, que corresponderam a 142 casos, e apenas 29 casos foram registrados para influenza (H1N1)pdm09. Durante esses dois anos a cidade de Porto Alegre foi uma das mais afetadas por esses vírus, como é possível observar na Figura 7 (SES-RS, 2014; SES-RS, 2015).

Figura 7 - Casos de influenza segundo regional de residência no Rio Grande do Sul 2013- 2014



Distribuição dos casos notificados para influenza no estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 2013 e 2014, de acordo com as regiões de residência. A cidade de Porto Alegre está circulada em cor vermelha. Fonte: Adaptado de SES-RS, 2015.

Indivíduos de todas as faixas etárias podem ser afetados pelos vírus influenza, porém, alguns grupos apresentam maior risco de adquirirem a doença e desenvolverem quadros graves. Esses grupos compreendem gestantes, crianças, idosos, indivíduos com condições imunossupressoras e condições médicas crônicas, como doenças cardiovasculares, pulmonares, renais, metabólicas, neurodegenerativas, hepáticas e hematológicas (WHO, 2018). Além disso, escolares, profissionais de saúde, idosos residentes em casas de repouso e indivíduos que convivem em locais com aglomerados de pessoas estão mais expostos a adquirirem a infecção pelo influenza e representam maior potencial de disseminação desses vírus (WHO, 2018; CDC, 2019a; BRASIL, 2019a).

Crianças são especialmente impactadas pelas epidemias de influenza, por ainda não possuírem uma resposta imune completamente formada e por permanecerem por longos períodos do dia em locais propensos à maior transmissão viral, como creches e escolas. Com isso, a taxa de infecção entre crianças chega a ser 3 vezes maior do que em adultos, resultando em taxas relevantes de absentismo nas escolas e de internações (FRANCIS; KING; KELVIN, 2019). As crianças representam verdadeiros amplificadores dos vírus influenza, sendo as principais e mais eficientes transmissoras desses vírus (SAUERBREI et al, 2009).

1.1.2 Os vírus influenza

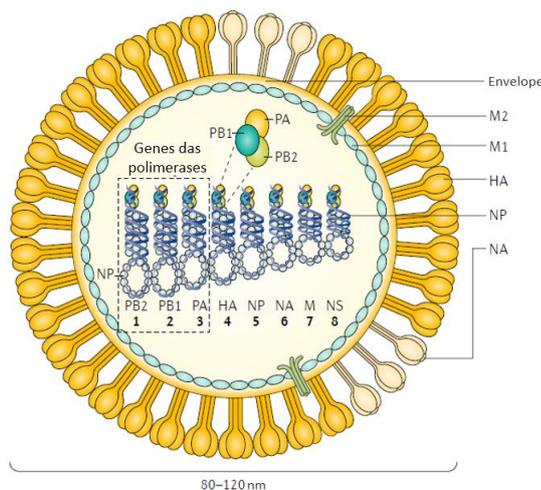
Os vírus influenza pertencem ao reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Polyploviricotina*, classe *Insthoviricetes*, ordem *Articulavirales* e família *Orthomyxoviridae*. São vírus envelopados, pleomórficos, podendo apresentar estruturas icosaédrica ou filamentosa, que variam entre 80 e 120nm, e possuem genoma de RNA de fita simples segmentado, de polaridade negativa. Até o momento, foram descritos quatro gêneros de influenza, *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus* e *Gammainfluenzavirus*, que agrupam os vírus influenza dos tipos A, B, C e D, respectivamente, classificados de acordo com suas diferenças genéticas e antigênicas (ICTV, 2019; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016). Os influenza A e B possuem maior relevância médica por estarem associados às epidemias mais recentes e serem responsáveis pela maioria dos casos humanos (WHO, 2018). Por esta razão, receberão maior foco nesse trabalho.

Os vírus influenza do tipo B são separados em diferentes linhagens, e são responsáveis por causar pequenas epidemias sazonais. Já os vírus do tipo A são classificados em subtipos de acordo com a combinação de duas glicoproteínas importantes da superfície viral, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Até o momento, já foram descritos ao menos 18 tipos de HA (identificados de H1 a H18) e 11 tipos de NA (identificados de N1 a N11), isolados de diferentes espécies (PAULES; SUBBARAO, 2017; PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016).

1.1.3 Genoma e estrutura viral

Os influenza A e B são estruturalmente muito similares. Eles possuem oito segmentos genômicos de RNA que codificam ao menos 11 proteínas, incluindo a HA e a NA, além das proteínas de matriz (M1), proteínas transmembrana de canal iônico (M2), polimerases (PB1, PB2 e PA), nucleoproteínas (NP) e proteínas não estruturais (NS1 e NS2) (BAHADORAN et al, 2016). Na partícula viral, esses segmentos de RNA ficam envolvidos por nucleoproteínas e estão associados às polimerases PB1, PB2 e PA, formando uma estrutura chamada complexo ribonucleoproteico (RNP). Esse complexo fica localizado na porção mais interna da partícula viral, envolto por proteínas M1, que formam a estrutura do capsídeo viral. O capsídeo, por sua vez, fica envolvido pelo envelope, que consiste em uma membrana lipídica, adquirida da célula hospedeira na qual a partícula foi produzida. Dessa membrana são projetadas as proteínas de superfície HA, NA e M2, para os influenza do tipo A, e HA, NA, e proteínas NB e BM2 para os influenza do tipo B. Todas essas proteínas ficam voltadas para a face externa do envelope e são responsáveis pela interação da partícula com o meio externo e com células hospedeiras, exercendo funções essenciais para a infectividade do influenza (PADILLA-QUIRARTE et al, 2019; KNIFE; HOWLEY, 2016; KRAMMER et al, 2018). A estrutura do vírus influenza A está representada na figura 8.

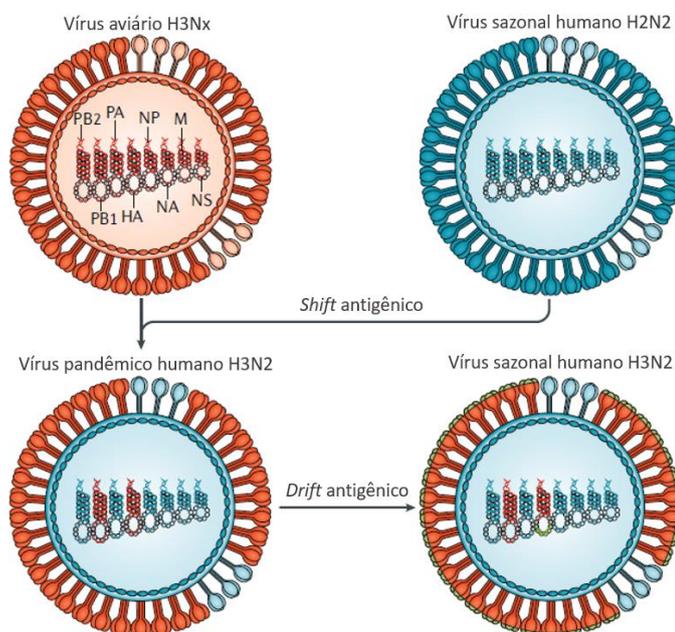
Figura 8 - Representação esquemática da partícula viral dos vírus influenza do tipo A



É possível visualizar o genoma de RNA segmentado do influenza, localizado no interior do capsídeo, associado à nucleoproteínas (NP) e a polimerases PB1, PB2 e PA, formando o complexo ribonucleoproteico. Também é possível observar a estrutura do capsídeo, composta por proteínas M1 e envolvida pelo envelope viral, do qual são projetadas as proteínas de superfície HA, NA e M2. Fonte: Adaptado de KRAMMER et al, 2018.

O genoma segmentado dos vírus influenza lhes confere a capacidade de gerarem alterações antigênicas através de mecanismos como o *shift* antigênico. Tal mecanismo permite que diferentes subtipos de influenza A troquem segmentos completos de RNA entre si, ao co-infectarem células de um mesmo hospedeiro. Essa troca é feita principalmente entre segmentos que codificam as proteínas HA e NA, e, se for eficaz, é possível que haja o surgimento de novos subtipos virais, contra os quais a população humana ainda não possui imunidade (KIM; WEBSTER; WEBBY, 2018). Além disso, os influenza também possuem a habilidade de gerarem alterações antigênicas através do mecanismo de *drift* antigênico, que permite a ocorrência e o acúmulo de pequenas mutações, principalmente em sítios de reconhecimento por anticorpos, facilitando assim a evasão de novos vírus de uma resposta imune previamente montada. Esses dois mecanismos, representados abaixo na figura 9, são responsáveis pelo surgimento de novos tipos de HA e NA e, conseqüentemente, de novos subtipos de influenza com potencial para causar epidemias e pandemias (KIM; WEBSTER; WEBBY, 2018; PAULES; SUBBARAO, 2017; BOUVIER; PALESE, 2008).

Figura 9 - Desenho esquemático dos mecanismos de drift e shift antigênicos do influenza.



Na figura estão representados os mecanismos que permitem as variações antigênicas dos vírus influenza: (1) através da troca de segmentos de RNA (*shift* antigênico); (2) através do acúmulo de mutações em sítios antigênicos (*drift* antigênico). Na parte superior da figura está representado o possível mecanismo que levou à introdução do vírus H3N2 pandêmico na população humana, na década de 60. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a troca de segmentos entre o vírus sazonal que circulava na época, H2N2, e algum vírus de origem aviária H3Nx (no qual X representa qualquer

tipo de HA). Na parte inferior está representado o possível mecanismo que levou o vírus pandêmico H3N2 a se estabelecer na população humana, através da ocorrência de mutações (*drift* antigênico), dando origem ao vírus humano sazonal H3N2. Fonte: Adaptado de KRAMMER et al, 2018.

1.1.4 Proteínas de superfície

A superfície das partículas do influenza é envelopada e recoberta de proteínas, que exercem funções essenciais para interação desses vírus com o hospedeiro e para a multiplicação viral. Aqui, o foco será dado às proteínas de superfície dos vírus influenza do tipo A, devido à sua maior relevância médica.

A HA é a proteína presente em maior abundância no envelope viral dos influenza do tipo A e fica ancorada no capsídeo, projetada externamente ao envelope. Ela é responsável por mediar a ligação da partícula à célula hospedeira, através da sua interação com moléculas de ácido siálico presentes na superfície celular, permitindo assim a internalização desses vírus. Além disso, é também uma proteína de fusão, responsável por mediar a fusão da partícula à membrana endossomal, sendo fundamental para a infectividade do influenza (KNIPE; HOWLEY, 2016; KRAMMER et al, 2018).

A NA é a segunda glicoproteína mais abundante na superfície viral e possui duas importantes funções: (1) promover a adesão da partícula à superfície celular, devido à sua capacidade de degradar muco; (2) facilitar a liberação de novas partículas a partir da superfície da célula hospedeira, através da clivagem da interação entre o ácido siálico e a HA (PADILLA-QUIRARTE et al, 2019).

Essas duas proteínas juntas compõem 90% da composição proteica da superfície dos influenza A e B, e por essa razão são importantes alvos da resposta protetora por anticorpos, induzida durante infecções causadas por vírus selvagens e vacinais. São proteínas imunodominantes, porém possuem uma grande variabilidade antigênica, permitindo que escapem dos mecanismos imunológicos com maior facilidade (KRAMMER et al, 2018). Elas são consideradas bons alvos vacinais e têm sido extensivamente estudadas, com o objetivo de se entender melhor a resposta induzida por esses vírus e identificar antígenos conservados, para a possível produção de uma vacina universal que atue contra diferentes subtipos de influenza

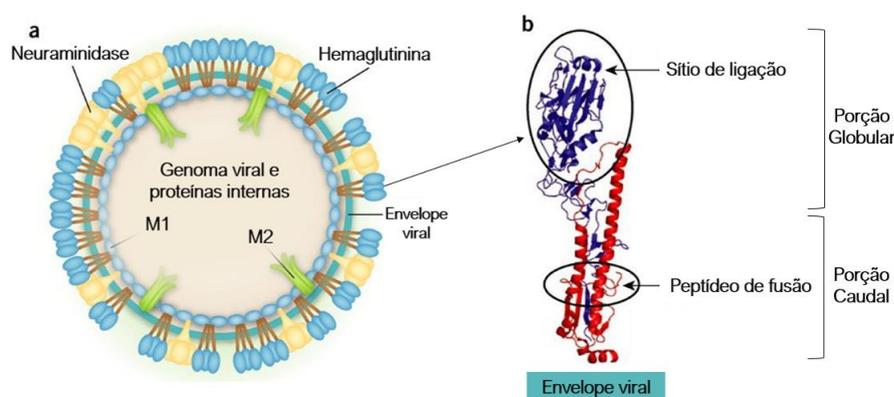
(KIM; WEBSTER; WEBBY, 2018). A HA recebe destaque nesse contexto devido à sua maior proporção na partícula viral e maior imunogenicidade.

1.1.5 Hemaglutinina

A HA é uma proteína fundamental para a multiplicação e infectividade dos vírus influenza. Entretanto, apesar de sua função importante, ela é a proteína viral de maior variabilidade antigênica, apresentando identidade geral de sequências de aminoácidos inferior a 50%. Ainda assim, ela continua sendo uma proteína de função e estrutura altamente conservadas (KNIPE; HOWLEY, 2016; GAMBLIN; SKEHEL, 2010). Em decorrência da sua frequência maior e função importante na partícula viral, ela é o principal alvo da resposta imune e, conseqüentemente, tem se tornado objeto de estudo de inúmeros trabalhos relacionados a esses vírus.

A HA é uma proteína trimérica formada por subunidades idênticas, produzidas na forma de um polipeptídeo precursor (HA0), que sofre clivagem pela ação de tripsinas teciduais, dando origem a dois polipeptídeos (HA1 e HA2). Esses peptídeos compreendem, respectivamente, as porções globular, projetada na superfície viral, e a porção caudal que fica inserida no envelope, representadas na Figura 10. A clivagem pela qual a HA passa é fundamental para as funcionalidades dessa proteína e para a efetividade dos processos de ligação e fusão da partícula viral à célula hospedeira (KNIPE; HOWLEY, 2016; GAMBLIN; SKEHEL, 2010; JANG; SEONG, 2014).

Figura 10 - Desenho esquemático da estrutura e localização da HA na partícula viral



(a) Localização da HA, em sua forma trimérica, na superfície do influenza, ancorada ao envelope viral. (b) Subunidade da HA, com seus dois segmentos, HA1 (representado na cor azul) e HA2 (representado na cor vermelha). Juntos esses dois segmentos formam as porções globular e caudal. Fonte: adaptado de WANG; PALESE, 2009.

A porção globular da HA é a região de maior variabilidade antigênica e contém o sítio de ligação com o receptor de ácido siálico, presente nas células hospedeiras. A maior parte dos anticorpos produzidos contra a HA é direcionada a esta porção e atua bloqueando a interação dessa proteína com a célula hospedeira, impedindo assim a internalização da partícula, afetando diretamente a infectividade desses vírus. Entretanto, devido à grande variabilidade antigênica dessa região, os vírus tendem sofrer mais mutações nesse domínio, induzidas pela pressão do sistema imune, e com isso conseguem escapar da ação de anticorpos induzidos por infecções anteriores e pela vacinação, uma vez que a maioria deles é produzida de maneira específica contra cada amostra viral (JANG; SEONG, 2014).

A porção caudal da HA consiste em uma região antigenicamente mais conservada e possui papel fundamental de permitir a fusão da partícula viral com a célula hospedeira. Quando comparada à porção globular, trata-se de uma região menos imunodominante, porém, anticorpos produzidos contra essa região são capazes de promover uma resposta mais abrangente, capaz de atuar contra diferentes subtipos de influenza (WANG; PALESE, 2009; JANG; SEONG, 2014).

A proteína HA tem sido explorada amplamente nas últimas décadas por se tratar de um dos alvos vacinais mais relevantes para o controle do influenza. Diversos estudos têm buscado identificar antígenos conservados nessas proteínas para o desenvolvimento de uma vacina universal capaz de atuar de maneira protetora contra diferentes tipos de influenza, sem que haja a necessidade de atualização constante da formulação vacinal, como é feito atualmente (JANG; SEONG, 2014; WANG; PALESE, 2009; GAMBLIN; SKEHEL, 2010; PADILLA-QUIRARTE et al, 2019). Este é um dos principais objetivos das pesquisas atuais que têm o influenza como objeto de investigação e os avanços nas últimas décadas são notórios, principalmente quanto ao controle da infecção por esses vírus. Entretanto, ainda há oportunidades para compreender melhor e mais profundamente as características desta proteína, os mecanismos da resposta imune induzidos contra ela e seu papel na interação entre os vírus influenza e os seus hospedeiros, para que novas abordagens terapêuticas e profiláticas possam ser propostas e viabilizadas.

1.1.6 Imunidade desencadeada contra o influenza

Já é sabido que a resposta imune induzida contra o influenza consiste na atuação conjunta de diversos mecanismos, tanto da resposta imune inata quanto da imunidade adaptativa do hospedeiro (BAHADORAN et al, 2016). Essa resposta varia de acordo com o subtipo viral e a antigenicidade de cada vírus, porém, os mecanismos gerais são similares (COUCH; KASEL, 1983).

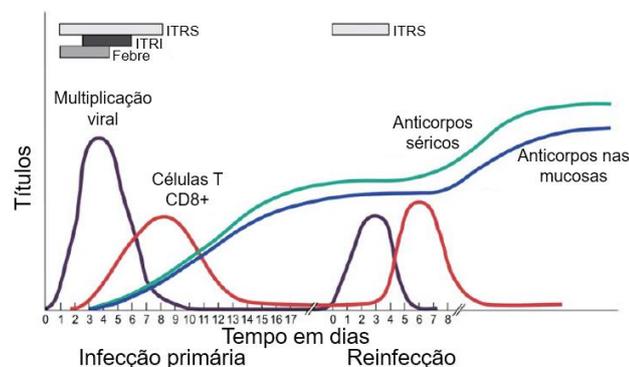
A resposta imune inata é considerada a linha de defesa inicial do organismo e tem papel fundamental na limitação rápida da infecção e na ativação de fatores da resposta imune adaptativa. Ela se inicia com o reconhecimento da presença dos vírus influenza por células epiteliais e células imunes residentes do trato respiratório, principalmente através de receptores dos tipos *Toll-like*, NOD (receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo), e RIG-I (genes indutores de ácido retinóico). A ativação desses receptores induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-1 β , e de fatores pró-apoptóticos e antivirais, como os interferons dos tipos I e III, além da ativação de neutrófilos e recrutamento de macrófagos e células dendríticas. Em conjunto, todos esses fatores atuarão com o intuito de impedir a infecção de novas células, controlar a multiplicação viral e iniciar os mecanismos da resposta imune adaptativa (BAHADORAN et al, 2016).

Diferentes fatores da resposta imune inata atuam induzindo a ação da imunidade adaptativa, que, em geral, se inicia através da ativação de células T CD8⁺ e CD4⁺. As células T CD8⁺, ao serem ativadas, se tornam células efetoras citotóxicas e atuam lisando e induzindo a apoptose de células infectadas. Já as células CD4⁺ atuam auxiliando na ação de células CD8⁺ de memória, na estimulação de respostas antivirais pelas células B, na troca de isotipos dos anticorpos produzidos e até mesmo com uma atividade citolítica, porém menos expressiva quando comparada à atividade das células CD8⁺. Por fim, ocorre também a ativação de células B que resulta na liberação de anticorpos, produzidos principalmente contra as proteínas de superfície do influenza, e estes irão atuar realizando o clareamento viral e conferindo proteção contra infecções futuras (PADILLA-QUIRARTE et al, 2019; KRAMMER et al, 2018).

Abaixo, a Figura 11 demonstra o curso da resposta imune e do quadro sintomatológico induzidos durante a infecção e reinfeção pelos vírus influenza.

Inicialmente, há a infecção do trato respiratório superior e um pico de multiplicação viral, acompanhado de sintomas sistêmicos. Em seguida, ocorre a infecção de células do trato respiratório inferior e o início da resposta imune, com a ação principalmente de células T CD8⁺. A resposta inata atua induzindo mecanismos da resposta adaptativa, que se inicia levando à produção gradual de anticorpos, que ficarão circulantes promovendo a indução de memória celular. Assim, na ocorrência de reinfecção, anticorpos presentes no soro e nas mucosas atuarão contra os vírus, levando a uma infecção menos produtiva, com baixa multiplicação viral e redução da sintomatologia (SUBBARAO; MURPHY; FAUCI, 2006).

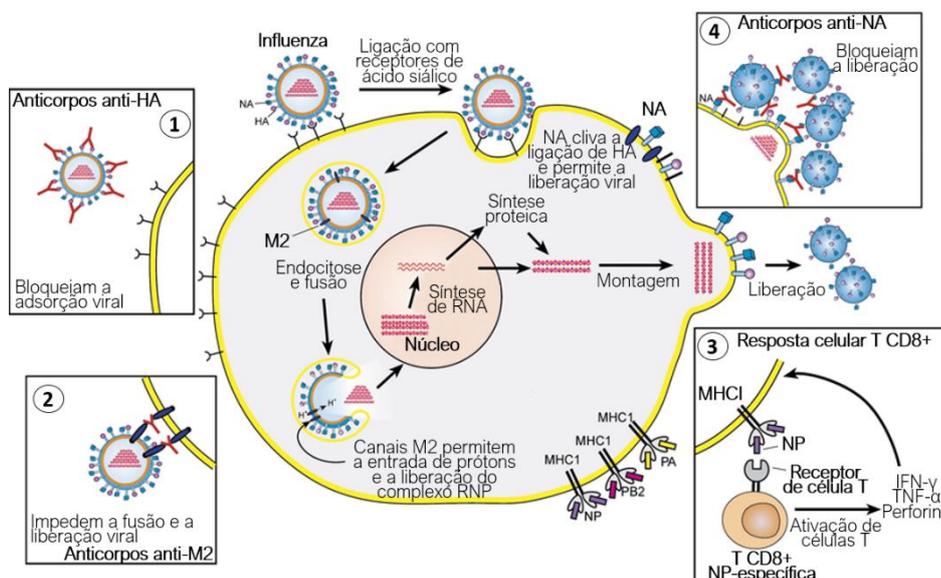
Figura 5 - Curso da resposta imune e sintomatologia na infecção pelo vírus influenza.



A figura representa o curso da resposta imune, representada pelas células T CD8⁺, anticorpos séricos e anticorpos nas mucosas, e dos sintomas induzidos durante a infecção pelos vírus influenza, representada pela multiplicação viral, e pelas infecções dos tratos respiratórios superior (ITRS) e inferior (ITRI). Fonte: adaptado de SUBBARAO; MURPHY; FAUCI, 2006.

Alguns dos principais mecanismos da imunidade adaptativa contra o influenza são: (1) a produção de anticorpos contra a HA, que atuam contra a interface da ligação dessa proteína com o ácido siálico, impedindo a adsorção e a entrada do vírus na célula; (2) a produção de anticorpos contra a proteína M2, que bloqueiam o desnudamento viral, interferindo na multiplicação; (3) a resposta mediada por células T CD8⁺ específicas contra proteínas, como aquelas do complexo RNP, o que resulta na liberação de citocinas de atividade antiviral, como interferons e perforinas; e (4) a produção de anticorpos contra NA, que atuam dificultando a liberação de novas partículas virais, limitando a infecção. Esses mecanismos estão ilustrados na Figura 12 (KRAMMER et al, 2018; SUBBARAO; MURPHY; FAUCI, 2006).

Figura 62 - Ciclo de multiplicação do influenza e atuação da imunidade adaptativa na infecção



Desenho esquemático do ciclo de multiplicação viral, mostrando como a imunidade adaptativa atua para conter a infecção pelos vírus influenza. Alguns dos principais mecanismos dessa resposta são: (1) a produção de anticorpos contra a HA, que bloquearão a adsorção da partícula viral à célula hospedeira; (2) a produção de anticorpos contra as proteínas M2, que interferirão na fusão e no desnudamento da partícula viral; (3) a ação de células T CD8+ específicas contra algumas proteínas virais, como a NP, que provocará uma resposta citolítica e a produção de fatores antivirais e pró-apoptóticos; e (4) a produção de anticorpos contra NA, que bloquearão a ação dessa enzima, dificultando a liberação da progênie viral. Fonte: modificado de SUBBARAO; MURPHY; FAUCI, 2006.

A produção de anticorpos contra a HA ainda é considerada o principal mecanismo de proteção contra o influenza, em decorrência da grande importância dessa proteína no ciclo de multiplicação viral e pelo fato desses anticorpos serem capazes de conferir uma proteção duradoura homossubtípica, quando não há a ocorrência de mecanismos de escape, como o *shift* ou *drift* antigênicos. A HA é atualmente o principal componente das vacinas contra influenza, diante da grande resposta por anticorpos induzida por essa proteína e em decorrência da variabilidade antigênica alta que possui (SUBBARAO; MURPHY; FAUCI, 2006).

1.1.7 Manifestações clínicas e patogênese

Os vírus influenza são facilmente transmitidos e disseminados entre os seres humanos, através de vias respiratórias (WHO, 2018; CASSINI et al, 2018). Já é conhecido que tais vírus possuem ao menos três mecanismos de transmissão, sendo eles: (1) a aspiração de gotículas de secreções respiratórias, liberadas durante a tosse ou espirros de indivíduos infectados; (2) a aspiração de aerossóis, que são pequenas

partículas de secreção provenientes de gotículas maiores, liberadas durante a tosse ou espirros; e (3) o contato direto ou indireto com secreções contendo partículas virais infectantes (PAULES; SUBBARAO, 2017).

Uma vez aspirados, os vírus influenza inicialmente estabelecem uma infecção local no trato respiratório superior, infectando e destruindo células epiteliais. Após o estabelecimento da infecção, há a produção de novas partículas e aumento na produção de secreções respiratórias, que levam ao aparecimento dos sintomas como tosse e espirros. Com isso, as partículas virais produzidas são liberadas pelas vias aéreas para serem transmitidas a novos hospedeiros, e também atingem o trato respiratório inferior, no qual são responsáveis por causar um grande dano tecidual que amplifica os sintomas respiratórios e favorece a infecção por outros microrganismos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016). Com isso, frequentemente há a ocorrência de complicações, como pneumonias secundárias, associadas às infecções pelos vírus influenza (PAULES; SUBBARAO, 2017).

Ao serem detectados pelo sistema imune do hospedeiro, os vírus influenza induzem uma grande resposta mediada por interferon e por outras citocinas, que são responsáveis pelo aparecimento de sintomas sistêmicos, como febre, mialgia e cefaleia. Os sintomas causados por esses vírus e a duração da infecção variam de acordo com o dano tecidual causado, tanto pelos vírus quanto pela resposta imune e o desfecho clínico dependerá de características virais e do hospedeiro. Em geral, a influenza é uma doença autolimitada e está pouco associada ao comprometimento de outros órgãos e tecidos, além do trato respiratório, e as principais complicações relacionadas à infecção ocorrem devido a infecções secundárias, geralmente bacterianas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016).

Os sintomas causados pelo influenza, em geral, aparecem de maneira abrupta, após um período de incubação de aproximadamente 2 dias, e são caracterizados principalmente pela febre, calafrios, cefaleia, artralgia, mialgia, tosse não produtiva, rinorreia, dor de garganta, prostração e mal-estar geral (BRASIL, 2019a; PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; WHO, 2018, CDC, 2019a). Além disso, podem ocorrer também sintomas oculares, como conjuntivite, fotofobia, dor ocular e lacrimejamento, além de sintomas gastrointestinais e outros associados a

complicações mais graves ou a piora de quadros de doenças crônicas prévias (PAULES; SUBBARAO, 2017; PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016).

A duração da sintomatologia varia de acordo principalmente com a idade e condição geral de saúde do indivíduo, com crianças e indivíduos imunocomprometidos apresentando maior duração do quadro clínico (PAULES; SUBBARAO, 2017, BAHADORAN et al, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016). A infecção por esses vírus geralmente apresenta resolução espontânea, após cerca de 7 a 15 dias, entretanto, alguns casos podem evoluir com complicações que podem ser graves e levar até mesmo à morte. As complicações causadas pelos vírus influenza podem ser respiratórias, como pneumonia (primária ou secundária) e bronquite, e não-respiratórias incluindo encefalite, miosites e rabdomiólises, insuficiência de múltiplos órgãos, além de diversas complicações cardiovasculares (como miocardite, e pericardite), dentre outras. A doença pode também agravar o quadro clínico de pessoas com doenças crônicas, como asma, diabetes e doenças cardiovasculares. Outra possível complicação da infecção pelo influenza é a ocorrência de resposta inflamatória exacerbada pelo organismo, que pode resultar em um estado de sepse, muitas vezes fatal. (WHO, 2018; CDC, 2019a; PAULES; SUBBARAO, 2017).

1.1.8 Importância dos estudos soropidemiológicos em influenza

Segundo um estudo realizado pelo Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças, a influenza é considerada a infecção viral de maior impacto no mundo, apresentando o maior percentual de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (30%), além de maior incidência e mortalidade, quando comparada com outras doenças infecciosas (CASSINI et al, 2018). Entretanto, ainda é difícil quantificar com precisão a incidência da gripe no mundo, uma vez que grande parte dos indivíduos infectados não procura os serviços de atendimento médico, por apresentarem sintomatologia mais branda ou por serem assintomáticos, e, portanto, não é diagnosticada (CDC, 2019a). Além disso, por estar associada ao agravamento de doenças crônicas, a influenza muitas vezes favorece o desenvolvimento de complicações não-respiratórias relacionadas à essas doenças, e nesses casos as últimas acabam sendo registradas como a causa primária de internação ou da morte, principalmente devido ao fato dessas complicações normalmente se desenvolvem

semanas após a infecção por esses vírus, ocasião que não são mais detectáveis nos pacientes. Mesmo nas ocorrências em que a presença dos vírus influenza é detectada, os registros emitidos raramente determinam a infecção como causa da morte (REDLBERGER-FRITZ et al, 2012; KADOGLOU et al, 2017).

Em geral, as estimativas acerca da incidência de influenza são feitas através da avaliação de taxas de hospitalização e morte durante períodos sazonais, além de modelagens matemáticas e extrapolações estatísticas, a partir de estudos epidemiológicos. Essas estratégias são bastante úteis para monitorar tendências sobre a sazonalidade dessa doença, porém, ainda são imprecisas (CDC, 2019b). A determinação direta da soroprevalência contra influenza, por exemplo, em uma determinada população, gera informações mais exatas e confiáveis acerca da situação epidemiológica real dessa doença e essas informações podem ser utilizadas para a avaliação de riscos e para orientar a tomada de decisões que envolvam a prevenção, controle e tratamento da gripe e suas complicações (ELIZONDO-MONTEMAYOR et al, 2011).

Atualmente, os testes sorológicos têm sido amplamente utilizados em estudos epidemiológicos que visam estimar a verdadeira incidência e prevalência de uma determinada doença ou patógeno em uma população. Eles permitem a identificação de anticorpos produzidos após o contato especificamente contra algum tipo de organismo e a detecção destes pode ser feita mesmo após a eliminação do causador da infecção, uma vez que podem permanecer em circulação por meses, anos e, até mesmo, ao longo de toda a vida do indivíduo (BROBERG; NICOLL; AMATO-GAUCI, 2011). Com isso, os estudos soropidemiológicos têm sido escolhidos principalmente para avaliar a prevalência de infecções de curta duração e que podem provocar quadros brandos e assintomáticos, como a influenza, pois, dessa forma, mesmo indivíduos que já tiveram resolução da infecção ou que não perceberam a presença do patógeno poderão ser detectados, gerando estimativas mais precisas.

Ensaio de inibição da hemaglutinação e de neutralização viral têm sido extensivamente utilizados em estudos soropidemiológicos, por serem capazes de discriminar e quantificar anticorpos produzidos contra diferentes tipos e subtipos de influenza, apesar de ainda haver o risco da ocorrência de respostas cruzadas. Porém,

os resultados obtidos a partir desses ensaios podem variar entre laboratórios, dependendo da forma como foram realizados. Além disso, se as amostras virais utilizadas não forem adequadas para o estudo e a população de interesse, é possível que haja uma subestimação da verdadeira soroprevalência de anticorpos contra um determinado subtipo ou tipo viral naquela população. Os ensaios de inibição da hemaglutinação e de neutralização viral não são indicados para a utilização em estudos de grandes proporções, por se tratarem de protocolos laboriosos, que não podem ser automatizados e que demandam, conseqüentemente, tempo e mão de obra altamente especializada (SAUERBREI et al, 2014; BROBERG; NICOLL; AMATO-GAUCI, 2011). Uma alternativa a esses ensaios são os testes imunoenzimáticos, onde o ensaio imunoenzimático, denominado pela sigla ELISA, é seu principal representante. Pelos ensaios de ELISA torna-se possível detectar e quantificar anticorpos produzidos contra diferentes tipos e subtipos de influenza, sem a necessidade de serem utilizadas partículas virais integras. Além disso, esses ensaios possuem protocolos de realização relativamente rápida, de custo baixo e podem ser completamente automatizados, permitindo assim o uso dessa metodologia em larga escala (SAUERBREI et al, 2014; ALSUWAIDI et al 2017). Existem hoje disponíveis no mercado diversos testes sorológicos enzimáticos para o diagnóstico de influenza, em geral com valores razoáveis de especificidade (90-100%), e com sensibilidades bastante variáveis. Porém, a maior parte dos testes disponíveis atualmente permite a detecção de anticorpos induzidos contra proteínas e antígenos mais conservados nos vírus influenza A e B, como a proteína N, conseqüentemente sem que haja um diagnóstico específico para subtipos virais (HURT et al, 2007; YUAN et al, 2011; LU et al, 2012)

Diversos estudos soroepidemiológicos têm sido realizados no mundo com o objetivo de se determinar com mais acurácia a real incidência de influenza em determinadas populações (ELIZONDO-MONTEMAYOR et al, 2011; SAURBREI et al, 2009; SAURBREI et al 2014; IWATSUKI-HORIMOTO et al, 2011; MCVERNON et al, 2014; VON KRIES et al, 2011; SAM et al, 2013; ALSUWAIDI et al, 2017; BODEWES et al; 2011; HOSCHLER et al, 2012). Esses estudos auxiliam na detecção de grupos vulneráveis e no acompanhamento dos efeitos de medidas de intervenção e prevenção aplicadas anteriormente, como por exemplo, índices de cobertura vacinal.

Além disso, através desses estudos é possível também prever o provável efeito que novas epidemias e pandemias poderão causar na saúde e na economia local e global. Entretanto, apesar de muitos estudos já terem sido realizados mundialmente, há ainda uma grande lacuna quanto à real incidência e prevalência de influenza, principalmente em países tropicais, como o Brasil (SAM et al, 2013).

1.2 Coorte de Estudos de Risco Cardiovascular em Adolescentes – ERICA

O Estudo do Risco Cardiovascular em Adolescentes, projeto ERICA, ao qual este trabalho está vinculado, é um estudo transversal multicêntrico e pioneiro, realizado em diversas escolas brasileiras, com o intuito de estimar a prevalência de fatores de risco cardiovascular em adolescentes de 12 a 17 anos, de cidades com mais de 100.000 habitantes. Este estudo visa avaliar biomarcadores potencialmente relacionados ao desenvolvimento futuro de doenças cardiovasculares precocemente na vida, através da análise de parâmetros como dieta, níveis de atividade física e ocorrência de infecções prévias, que poderiam predispor essa população a um maior risco cardiovascular, uma vez que essa informação ainda não foi coletada para essa população (BLOCH et al, 2015; CUREAU et al, 2017; VASCONCELLOS et al, 2015).

Um dos fatores proposto para ser investigado no estudo foi a prevalência de anticorpos contra os vírus influenza na população de adolescentes escolares brasileiros, uma vez que a presença destes pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e também pelo fato dessa população estar constantemente exposta a infecções por esses vírus por estarem em um ambiente escolar, que favorece a transmissão e disseminação viral (VASCONCELLOS et al, 2015).

Diversos trabalhos na literatura já demonstraram a relação existente entre infecções pelos vírus influenza e a ocorrência ou agravamento de doenças cardiovasculares, como miocardite, pericardite, infarto agudo do miocárdio e aterosclerose, dentre outras (CDC, 2019c; WARREN-GASH; SMEETH; HAYWARD, 2009; NGUYEN et al, 2016; KADOGLOU et al, 2017; KWONG et al, 2018; BARNES et al, 2015; UDELL et al, 2013). A grande maioria desses estudos demonstrou aumento na mortalidade e incidência de doenças cardiovasculares durante períodos de maior circulação do influenza, além de maior risco de ocorrência de eventos cardiovasculares agudos

durante os dias imediatamente após a infecção e a longo prazo (WARREN-GASH; SMEETH; HAYWARD, 2009; NGUYEN et al, 2016; KADOGLOU et al, 2017).

Os mecanismos que explicariam o aumento no risco cardiovascular desencadeado pelo influenza ainda não foram totalmente esclarecidos, porém, algumas hipóteses foram propostas e estão relacionadas ao estado inflamatório e pró-coagulante, gerado pela infecção, que levariam a alterações endoteliais e cardiorrenais transitórias, bem como a ocorrência de reatividade antigênica cruzada mediada por anticorpos anti-HA, gerados contra o vírus influenza, que interagem com receptores de Apolipoproteína B, levando à desregulação lipídica e a deposição de lipídeos e componentes inflamatórios em placas de aterosclerose. Essa reatividade antigênica cruzada ocorre, segundo Pleskov, Bannikov e Zaitsev (1994), devido a algumas linhagens dos vírus influenza possuírem sequências de aminoácidos da HA viral muito semelhantes a sequências da Apolipoproteína B, responsável pela ligação de lipoproteínas de baixa densidade aos seus receptores, mediando processos de degradação dessas lipoproteínas. Com isso, é possível que anticorpos gerados contra infecções prévias por influenza reajam de maneira cruzada contra esses receptores, resultando em hipercolesterolemia que, agravada por dietas ricas em lipídios, pode levar à deposição subendotelial maior de lipídios e produtos imunes, aumentando assim o risco cardiovascular (WARREN-GASH; SMEETH; HAYWARD, 2009; PERETZ; AZRAD; BLUM, 2019; MADJID et al, 2005).

Dentre os mecanismos citados, a ocorrência de reatividade antigênica cruzada representa um fator de grande relevância devido ao fato da aterosclerose ser uma das principais causas de doenças cardiovasculares no mundo e ao fato de anticorpos gerados contra o influenza permanecerem circulantes por anos, através da memória imunológica e da ocorrência de novos estímulos antigênicos, em decorrência a reinfecções e vacinações (CATE et al., 1997; COUCH; KASEL, 1983).

Diante do exposto, a hipótese a ser investigada nesse trabalho é a de que a população de adolescentes escolares do Rio Grande do Sul apresenta um perfil de reatividade elevado contra as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza, referentes aos subtipos virais (H1N1)pdm09 e H3N2 circulantes nas américas durante 2013 e 2014.

2 JUSTIFICATIVA

Os vírus influenza atingem anualmente cerca de 40 milhões de pessoas, causando infecções que podem evoluir para complicações e hospitalizações, resultando na notificação de milhares de mortes e milhões de casos graves em todo o planeta. Eles representam uma causa importante de mortalidade e morbidade no mundo, gerando impactos consideráveis tanto na saúde quanto na economia global.

Os sistemas de vigilância epidemiológica para influenza são órgãos responsáveis pela realização das estimativas de incidência e do impacto de influenza no mundo, e essas estimativas são feitas, principalmente, através da avaliação de taxas de hospitalização e óbitos. Essas estratégias auxiliam no monitoramento das tendências de circulação dos diferentes tipos de influenza, na detecção dos principais subtipos potencialmente circulantes nos próximos anos e provável impacto desses vírus na população. Porém, apesar desse monitoramento gerar informações atualizadas, as estimativas feitas dificilmente se aproximam da realidade, uma vez que apenas uma parte das pessoas infectadas procura os serviços de atendimento à saúde e é devidamente diagnosticada (REDLBERGER-FRITZ et al, 2012; GREEN et al, 2013). Dessa forma, não é ideal que a vigilância epidemiológica para influenza seja feita apenas baseada na contagem de casos e óbitos, pois essa contagem pode subestimar a real incidência/prevalência e impacto dessa doença na população geral e em populações específicas.

Já foi demonstrado por diversos estudos observacionais que grande parte da população, por já ter entrado em contato com os vírus influenza em algum momento da vida, possui algum nível de imunidade prévia contra esses vírus (FRANCIS; KING; KELVIN, 2019). Além disso, apesar de existirem diferenças antigênicas e genéticas entre os subtipos de influenza circulantes a cada ano, algum nível de reatividade cruzada pode ser esperado entre esses vírus (REED; KATZ, 2010). Embora a imunidade mediada por anticorpos seja apenas uma parte da resposta imune complexa montada pelo organismo, frente às infecções pelos vírus influenza, a detecção desses anticorpos permite que seja feita a estimativa acerca do contato prévio de um indivíduo com determinados tipos de influenza, permitindo a verificação da real incidência/prevalência desses vírus em diferentes populações (ELIZONDO-

MONTEMAYOR et al, 2011). Nesse contexto, os estudos soropidemiológicos podem atuar de maneira importante, fornecendo informações mais precisas aos serviços de vigilância acerca da incidência/prevalência da gripe em determinadas populações. Esses estudos permitem o acompanhamento das taxas de soroprevalência ao longo do tempo, e essas informações proporcionam maior compreensão acerca da transmissão viral entre as comunidades e a identificação de grupos possivelmente protegidos ou vulneráveis (BROBERG; NICOLL; AMATO-GAUCI, 2011). Além disso, as informações geradas por esses estudos podem ser utilizadas para cálculos mais precisos dos impactos a serem causados por novas epidemias e análises mais aprofundadas para avaliação de estratégias de controle e prevenção aplicadas anteriormente, como, por exemplo, campanhas de vacinação (REED; KATZ, 2010).

A realização de estudos soropidemiológicos para influenza, especialmente no Brasil, é de grande relevância no cenário atual, considerando a circulação elevada desses vírus e o fato das estimativas da incidência/prevalência de influenza no país ainda serem feitas com base em taxas de óbito e casos graves, fazendo com que essas estimativas não sejam precisas, e conseqüentemente, o real impacto dessa doença não seja conhecido. Além disso, a literatura tem demonstrado que as infecções por influenza estão relacionadas a diversos fatores não antes estudados, como o agravamento de doenças cardiovasculares e da aterosclerose. As conseqüências potenciais a longo prazo das infecções por influenza relacionadas a esses fatores ainda não foram avaliadas na população geral, nem mesmo em populações que apresentam maior risco de infecção, pois ainda não há relatos de investigações mais profundas acerca da real incidência/prevalência de influenza nessas populações.

Atualmente, crianças e adolescentes representam os grupos de risco maior de infecção por influenza, uma vez que estão mais expostas ao contato com esses vírus no ambiente escolar. Considerando que crianças acima de 2 anos de idade não recebem a vacina contra influenza no Brasil e que a vacinação desse grupo no país teve início apenas em 1999, amostras de uma população de adolescentes entre 12 e 17 anos, coletadas entre os anos de 2013 e 2014, que forem soropositivas para esses vírus, provavelmente são provenientes de indivíduos que foram infectados naturalmente por eles. Portanto, a avaliação de marcadores de infecções prévias por

esses vírus nessa população de adolescentes configura uma oportunidade única de se estimar o perfil de reatividade dessa população para os vírus influenza.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a reatividade sérica de adolescentes escolares, de 12 a 17 anos, residentes no estado Rio Grande do Sul, contra as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza (H1N1)pdm 09 e H3N2, que circularam na América do Sul entre 2013 e 2014.

3.2 Objetivos específicos

- Construir proteínas recombinantes H1 e H3, a partir de sequências provenientes de vírus influenza que circularam na América do Sul;
- Estabelecer um ensaio imunoenzimático para a identificação da reatividade contra as proteínas recombinantes H1 e H3 de vírus influenza que circularam na América do Sul;
- Avaliar a reatividade de adolescentes escolares, residentes no estado do Rio Grande do Sul, contra as proteínas recombinantes H1 e H3 de vírus influenza que circularam na América do Sul.

4 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População do estudo

Com o objetivo de se estimar a prevalência de fatores de risco cardiovascular na população de adolescentes escolares do Brasil, entre fevereiro de 2013 e novembro de 2014, o projeto ERICA coletou, de aproximadamente 40 mil adolescentes escolares de diversos estados do país, dados sociodemográficos, clínicos, antropométricos, nível de atividade física e recordatório alimentar, além de amostras de sangue, para realização de exames bioquímicos. Os critérios adotados para inclusão dos adolescentes nesse estudo foram: (1) escolares com idade variando entre 12 e 17 anos; (2) possuir amostras de sangue coletada com a devida permissão; e (3) possuir informações coletadas sobre dados demográficos, medidas antropométricas, recordatório alimentar e pressão arterial durante o período do

estudo. Para as análises que cabem a este trabalho, foram utilizadas 957 amostras de soro desse estudo, referentes a adolescentes do ERICA que frequentavam escolas na cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul. Os adolescentes eram 39,2% pertencentes ao sexo masculino e 60,8% pertencentes ao sexo feminino e apresentavam idade variando entre 12 a 17 anos, com média de 14,8 anos. As amostras foram coletadas em tubos de soro contendo gel separador, centrifugadas para separação do soro e este foi aliquoteado e armazenado a -80°C até o momento da realização das análises. As amostras foram despachadas congeladas para o Instituto René Rachou em Belo Horizonte, por meio de contratação de transporte específico para amostras biológicas e armazenadas nas mesmas condições da origem. As amostras estavam codificadas e os ensaios foram realizados às cegas.

Como controles dos ensaios de reatividade, foram utilizadas amostras sabidamente soronegativas e soropositivas para influenza (H1N1)pdm09, provenientes de indivíduos não-vacinados e vacinados contra esse tipo de influenza, até o ano de 2010. O perfil de resposta das amostras foi confirmado através de ensaios de inibição da hemaglutinação, considerado o padrão-ouro para diagnóstico sorológico de influenza (MOROKUTTI et al, 2013). Essas amostras são provenientes do estudo de “Caracterização fenotípica e funcional da resposta imune de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09” (SILVA, 2015), e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo e pela Dra. Sarah Giarola da Silva, pesquisadores do Instituto René Rachou.

4.1.1 Questões éticas

O estudo ERICA obedece aos princípios da Declaração de Helsinque (1964), incluindo suas emendas de revisão da África do Sul (1996), e foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos 27 estados participantes do estudo. O protocolo e consentimento informado foram submetidos à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro e dos demais centros participantes.

4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes H1 e H3

Para a realização dos ensaios de reatividade desse estudo, foi necessário, inicialmente, a expressão e purificação de proteínas recombinantes H1 e H3,

correspondentes aos vírus influenza do tipo A (H1N1)pdm09 e aos vírus do tipo A H3N2, respectivamente, uma vez que estes são os vírus influenza de maior importância clínica e circulação atualmente no Brasil. Para isso foram realizadas etapas de seleção das sequências de interesse referentes as proteínas H1 e H3, feitas sob a supervisão do Dr. Jeronimo Conceição Ruiz e do Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, pesquisadores do Instituto René Rachou. Em seguida, foram realizadas as etapas de síntese gênica, a partir das sequências selecionadas, subclonagem dos genes sintetizados para cada proteína em vetores de expressão pET30a e transformação de linhagens de bactérias *E. coli* com os plasmídeos subclonados para expressão das proteínas recombinantes, que ao final foram purificadas e solubilizadas, conforme descrito a seguir.

4.2.1 Seleção das sequências de H1 e H3 e síntese gênica

Para representar os genótipos de influenza circulantes durante os anos de 2013 e 2014, período em que foram feitas as coletas das amostras dos adolescentes, foram selecionadas sequências proteicas de H1 e H3, referentes aos principais genótipos de influenza A, (H1N1)pdm09 e H3N2, que circularam nas américas durante esse período. A recuperação dessas sequências foi feita utilizando-se o banco público de dados *Influenza Virus Database*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>), com a utilização de operadores *booleanos*, ou seja, termos que definem os critérios de busca, para o período compreendido entre 2013 e 2014. Essa recuperação permitiu a extração de sequências de proteínas associadas aos termos: (1) H1 Sul temperado e H1 Sul tropical; e (2) H3 Sul temperado e H3 Sul tropical.

Posteriormente, foi realizado o alinhamento múltiplo global das sequências recuperadas para cada proteína, através da utilização do programa MAFFT v6.864b (NAR 30:3059-3066,2002, Briefings in Bioinformatics 9:286-298,2008), e após o alinhamento, foi utilizado o programa Jalview (<http://www.jalview.org>) para visualização e extração das sequências consenso das proteínas H1 e H3. Em seguida, essas sequências foram submetidas ao processo de tradução reversa, através do uso do programa TBLASTN, do NCBI (link: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), no qual foi feita a tradução seguida de comparação da sequência de aminoácidos de interesse com

um banco de dados de sequências nucleotídicas, também do NCBI, e assim foi escolhida a sequência gênica mais próxima à sequência consenso gerada para cada proteína. O parâmetro de corte de *e-value* utilizado na busca foi de 10^6 .

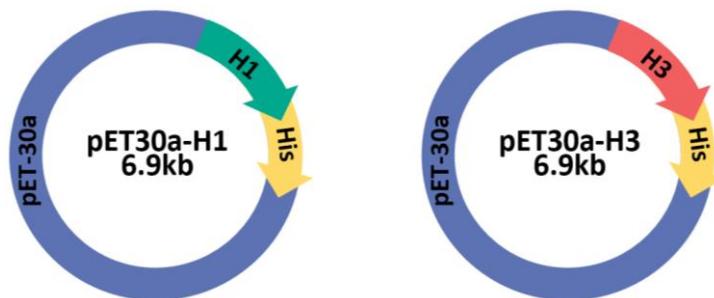
As sequências gênicas selecionadas, a partir das sequências consenso das proteínas H1 e H3, foram enviadas para a empresa GenScript® (Piscataway, EUA), que foi responsável por realizar, sob nossa supervisão, a síntese gênica, subclonagem e expressão das proteínas de interesse, de acordo com a metodologia descrita abaixo.

4.2.2 Subclonagem dos genes de H1 e H3 em vetores pET30a

As sequências gênicas obtidas para H1 e H3 foram sintetizadas para construtos pET30a, que consistem em plasmídeos desenvolvidos para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes, em bactérias *E. coli*. As sequências sintetizadas foram subclonadas nesses vetores e o uso destes apresentou duas vantagens: (1) níveis mais elevados de expressão das proteínas de interesse, por conterem a região promotora T7, reconhecida pela RNA polimerase T7, que é mais ativa que a polimerase da bactéria; e (2) maior facilidade na purificação, devido à presença de sequências codificadoras de caudas de histidina, que são fusionadas às proteínas expressas, o que favorece a obtenção dessas proteínas por cromatografia de afinidade, através do uso de colunas de níquel. Além disso, esses plasmídeos permitem também a regulação da expressão proteica, por conterem o *operon lac*, que reprime a expressão na ausência de indutor de galactosidase (IPTG). Com isso, as proteínas de interesse são expressas apenas após a adição desse indutor (NOVAGEN, 1999).

Foram construídos dois plasmídeos recombinantes com as sequências consenso, um para sequência de H1 e um para a sequência de H3, de acordo com a representação esquemática abaixo (Figura 13).

Figura 73 - Construtos pET30a com as seqüências das proteínas H1 e H3



Foram construídos dois plasmídeos recombinantes, contendo as seqüências consenso dos genes das proteínas H1 e H3, fusionadas a caudas de histidinas. Os plasmídeos pET30a possuem tamanho de 5,4kb e as seqüências consenso apresentam tamanho médio de 1,5kb, dando assim origem a um construto de tamanho final de 6,9kb para cada proteína (NOVAGEN, 1999). Fonte: imagem elaborada pela autora.

4.2.3 Expressão e purificação das proteínas H1 e H3

Após a construção dos plasmídeos recombinantes, cepas das bactérias *E. coli* SHuffle e *E. coli* BL21(DE3) foram utilizadas para expressão das proteínas H1 e H3, respectivamente. As cepas foram transformadas com os plasmídeos recombinantes pET30a-H1 e pET30a-H3 e inoculadas em meio de cultura Luria Bertani contendo Canamicina, para seleção das bactérias transformadas. As culturas foram incubadas a 37°C, em agitação de 200rpm, e quando a densidade celular (DO) desejada foi obtida (DO=0.6-0.8 em 600nm), a expressão proteica foi induzida com a adição de 0,2mM de IPTG, sendo utilizados protocolos com períodos de 16 horas a 15°C ou 4 horas a 37°C.

Após o cultivo, as cepas foram centrifugadas, os *pellets* formados foram lisados por sonicação e os sobrenadantes dos cultivos foram purificados por cromatografia de afinidade em colunas de níquel, sendo utilizado para a eluição um gradiente de imidazol, nas concentrações de 20mM, 50mM e 500mM. O monitoramento da expressão das proteínas foi feito através de eletroforese em gel de poliacrilamida, com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), e *Western blot*, utilizando-se anticorpos anti-histidina (Anti-his) para marcação. Uma vez determinada a melhor estratégia para purificação das proteínas, o protocolo para purificação destas foi feito para H1 e H3.

4.2.4 Solubilização das proteínas H1 e H3

Devido a dificuldades encontradas na obtenção de quantidades apropriadas das proteínas recombinantes H1 e H3, nas frações solúveis dos extratos bacterianos, foi realizada uma estratégia de *refolding* das proteínas, utilizando-se uma solução composta de tampão fosfato-salino (PBS) com 500mM de NaCl, 500mM de L-Arginina, 10% de glicerol, com pH ajustado para 8.0, para a proteína H1, e tampão PBS, 500mM de NaCl, 500mM de L-Arginina e 10% de glicerol, com pH ajustado para 7.4 para a proteína H3. Essa composição teve o objetivo de auxiliar na estabilização, reduzir a agregação e aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes expressas. Uma vez expressas, purificadas e solubilizadas, as proteínas H1 e H3 foram armazenadas para utilização nos ensaios imunoenzimáticos realizados nesse estudo.

4.3 Confirmação do perfil de reatividade do grupo controle por ensaio de Inibição da Hemaglutinação

As amostras que compunham o grupo controle do estudo, provenientes de indivíduos vacinados e não-vacinados contra (H1N1)pdm09, foram avaliadas para verificação dos níveis de anticorpos neutralizantes, por meio da realização de ensaios de inibição da hemaglutinação, conforme descrito pelo *Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza*, sem modificações (WHO, 2011).

Para a realização deste ensaio, inicialmente, 50µL do soro de participantes do grupo controle foram adicionados à primeira fileira de poços de placas de microtitulação, e aos demais poços das placas foram adicionados 25µL de PBS. Em seguida foi realizada diluição seriada das amostras, com um fator de diluição de 1:2, a partir da primeira fileira até a última das placas (1:2.048). Após a diluição dos soros, 25µL de uma suspensão viral contendo amostra de vírus influenza pandêmico isolado de um paciente em 2010 no Brasil, que teve seus títulos hemaglutinantes previamente determinados, foram adicionados a todos os poços das placas e após homogeneização, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por um período de 15 a 30 minutos. Por fim, foram adicionados a todos os poços 50µL de suspensão de hemácias de peru estabilizadas a 1%, e após a homogeneização e nova incubação a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos, foram realizadas as leituras das placas,

nas quais os títulos de inibição da hemaglutinação foram determinados como iguais à última diluição do soro-teste que inibiu a hemaglutinação completamente.

O protocolo desse ensaio foi realizado sob a supervisão da Dra. Sarah Giarola da Silva e do Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, pesquisadores do Instituto René Rachou.

4.4 Ensaio imunoenzimático para avaliação da reatividade contra H1 e H3

As proteínas sintetizadas nas etapas anteriores foram utilizadas para os ensaios de reatividade, que consistiram na realização de um ELISA indireto *in house*, utilizando-se as proteínas recombinantes H1 e H3, produzidas, como soluções antigênicas.

Os ensaios de ELISA consistem em técnicas para a detecção e quantificação de anticorpos ou antígenos, através de reações enzimáticas. Essa técnica foi descrita pela primeira vez em 1971, por Engvall e Perlmann, e desde então tem sido amplamente utilizada e adaptada para atender diferentes demandas. Os ensaios de ELISA indiretos são uma adaptação da técnica descrita por Engvall e Perlmann, nos quais antígenos de interesse são imobilizados em superfícies sólidas, geralmente microplacas de poliestireno de 96 poços, através de adsorção passiva. Após a adsorção dos antígenos, um tampão de bloqueio é adicionado aos poços para saturar os sítios de ligação inespecífica. Em seguida, são adicionados anticorpos primários específicos para os antígenos presentes nas placas, geralmente contidos em amostras biológicas. Então, um segundo anticorpo conjugado a uma enzima é adicionado aos poços e este anticorpo secundário deve se ligar aos anticorpos presentes nas amostras biológicas, atuando como um conjugado para reação. Todas as etapas passam por um processo final de lavagem, que tem o objetivo de retirar qualquer tipo de resíduo que possa ter permanecido na placa, permitindo que apenas os anticorpos ligados aos seus sítios específicos permaneçam nos poços. Assim, ao final da etapa de adição dos anticorpos secundários, estarão presentes apenas as enzimas que estiverem conjugadas aos anticorpos ligados. Em geral são utilizadas enzimas que, após reagirem com seus substratos, geram produtos que emitem cor ou luminescência, que podem ser mensurados gerando valores correspondentes às quantidades de antígenos e anticorpos presentes em cada um dos poços (LIN, 2015).

4.4.1 Avaliação do perfil de reatividade da população do estudo contra H1 e H3

Após a estabelecimento do protocolo de ELISA, foi realizada a caracterização sérica do perfil de reatividade contra as proteínas H1 e H3, da população do estudo. Inicialmente, foi feita uma análise-piloto (prova de conceito), utilizando 100 amostras dos adolescentes participantes do projeto ERICA e 8 amostras de indivíduos sabidamente negativos para infecções por influenza, que constituíram o grupo controle.

A prova de conceito inicial (dados não mostrados) e as análises subsequentes foram feitas utilizando-se o protocolo de ELISA estabelecido, que consistiu, inicialmente, na adsorção de placas de 96 poços para uso em ELISA (Maxsorb, Nunc, Hampton, NH, USA) com 100µl/poço das proteínas recombinantes H1 e H3 diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6) em uma concentração de 125ng/ml, durante 16 horas a 4°C. Após o período de adsorção, foram feitas cinco lavagens, com 200µl/poço de PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (PBST). Em seguida, foram adicionados 200µL/poço de PBST + 3% de albumina bovina (PBST3%BSA), sendo feita incubação de 1 hora a 37°C, para realização do bloqueio de sítios inespecíficos de ligação nas placas. Após o bloqueio, foram adicionados 100 µl/poço dos soros-testes da população do estudo e do grupo controle, diluídos em PBST3%BSA em um fator de diluição de 1:50, sendo feita uma nova incubação por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, foram realizadas mais cinco lavagens com PBST, e então 100µl/poço de anticorpos anti-IgG humano, ligados à peroxidase (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), diluídos em PBST3%BSA, em uma concentração de 1:1000, foram acrescentados às placas, que ficaram em incubação por 1 hora a 37°C. Após essa etapa as placas foram novamente lavadas com PBST e reveladas com solução cromogênica de tetrametilbenzidina (Thermo scientific, Rockford, IL, USA), por um período de 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao final desse tempo, foi realizada a parada da reação enzimática, com a adição de 50µL/poço de solução de ácido sulfúrico a 2N. Por fim, foram realizadas as leituras das DOs das amostras e dos poços brancos (PBST3%BSA), em espectrofotômetro para microplacas Spectramax M3 (Molecular Devices LLC, California, USA), em um comprimento de onda de 450nm, e os resultados das DOs foram obtidos através do programa SoftMax Pro v.5.3 (Molecular Devices LLC, California, USA).

Foram processadas um total 957 amostras dos adolescentes do projeto ERICA, de acordo com o protocolo estabelecido acima, e após o processamento e obtenção dos valores de DO para cada uma das amostras, foram feitas efetivamente as análises de reatividade contra as proteínas H1 e H3 para a população do estudo.

4.5 Análise dos resultados de reatividade

Para a análise dos resultados da reatividade, obtidos para cada uma das amostras, foram calculados valores de DO final (DO_f), através da subtração da média (X) dos valores de DO obtidos para os poços dos brancos de cada placa, de cada um dos valores de DO obtidos para as amostras dos adolescentes e do grupo controle. Dessa forma, o valor de DO_f foi calculado de acordo com a fórmula:

$$DO_f = DO - X$$

Na qual:

DO_f = valor de DO final de cada amostra

DO = valor de DO de cada amostra

X = média dos valores de DO dos brancos de cada placa

Os valores de DO_f das amostras dos adolescentes e do grupo controle foram utilizados nos cálculos feitos para a definição do ponto de corte do ensaio. O ponto de corte representa o valor médio para que uma amostra possa ser considerada soropositiva ou soronegativa para os antígenos avaliados, H1 e H3. Dessa forma, quando o valor de DO_f de uma amostra é superior ao valor do ponto de corte, essa é considerada soropositiva, e quando o valor de DO_f é inferior ou igual ao valor do ponto de corte, a amostra é considerada soronegativa para o antígeno avaliado.

Para a determinação dos valores de ponto de corte do estudo, inicialmente foram selecionados aleatoriamente valores obtidos de DO_f de vinte amostras para cada uma das proteínas avaliadas. A partir desses valores, juntamente com os valores obtidos para as amostras do grupo controle negativo, foram geradas Curvas Roc, ou *receiver operating characteristic curve*, para cada uma das proteínas recombinantes. A partir da análise das curvas geradas, e dos valores de sensibilidade, especificidade

e ponto de corte obtidos para cada uma delas, foram geradas curvas TGRoc para definição do ponto de corte do ensaio para cada proteína, através da combinação ótima de valores de sensibilidade e especificidade. As curvas ROC e TGRoc foram construídas utilizando-se o programa GraphPad Prism v.8.0.2 (GraphPad Software, California, USA).

Após a determinação do ponto de corte através da análise das curvas TGROC, o perfil de reatividade das amostras dos adolescentes e do grupo controle foi analisado, a partir da representação dos dados em gráficos de dispersão, com o intuito de visualizar a distribuição dos valores de DO_f obtidos para os participantes do estudo.

Além disso, com intuito de melhor descrever o perfil de reatividade da população do estudo contra as proteínas H1 e H3, foram avaliados outros dois parâmetros complementares: (1) assinaturas de reatividade construídas com base na categorização dos participantes do estudo como altos ou baixos reatores, usando a mediana global dos valores de DO_f como ponto de corte; (2) assinaturas de reatividade construídas com base na categorização dos participantes do estudo como altos, intermediários ou baixos reatores, utilizando-se os valores de tercis globais (33,3%) dos valores de DO_f como pontos de corte.

A análise estatística entre os dois grupos foi realizada por meio do teste T de Student, sendo os valores considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$. Também foi determinada a taxa de soropositividade (%) para as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza na população estudada.

5 RESULTADOS

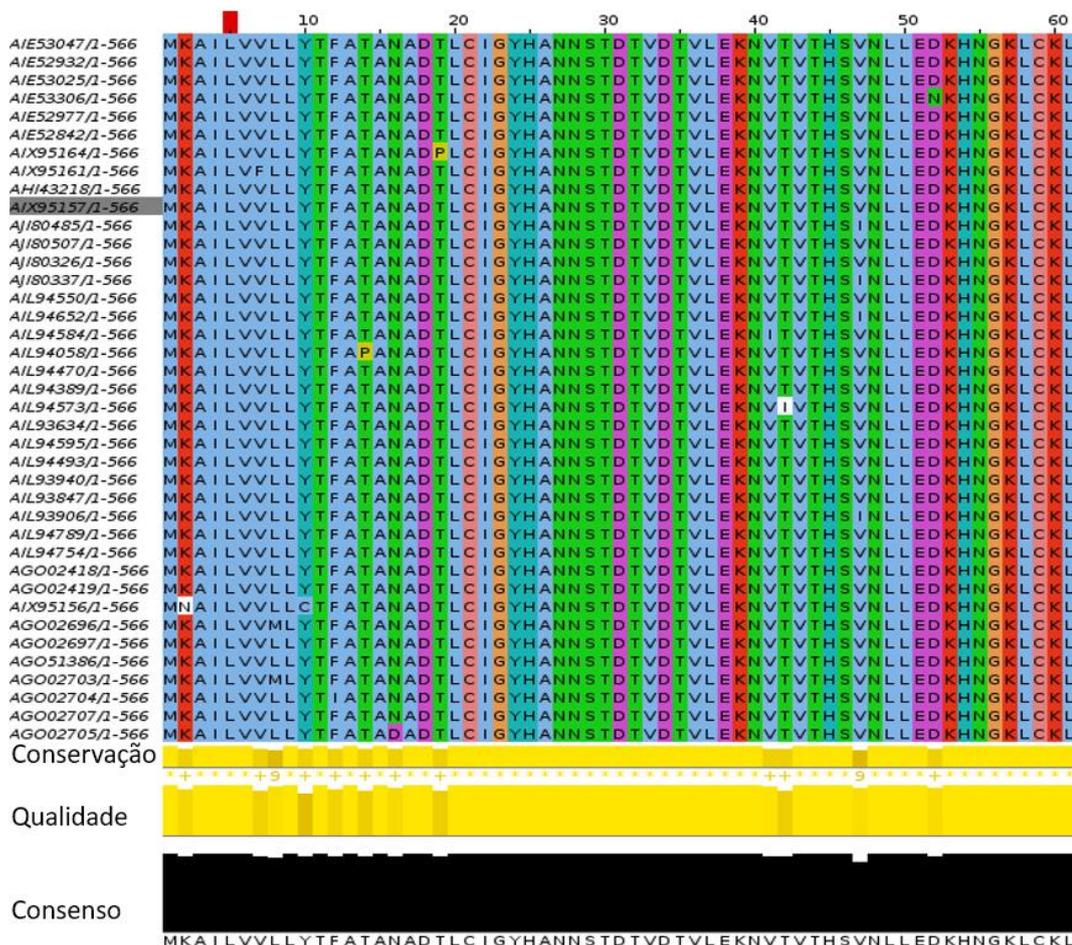
5.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes H1 e H3

5.1.1 Seleção das sequências de H1 e H3, síntese gênica e subclonagem dos genes em vetores pET30a

A partir da busca feita no banco de dados *Influenza Virus Database*, foram recuperadas 39 sequências referentes à proteína H1 e 22 sequências referentes à proteína H3. Com o alinhamento dessas sequências, foram geradas sequências consenso para cada uma dessas proteínas. Uma parte do alinhamento dessas

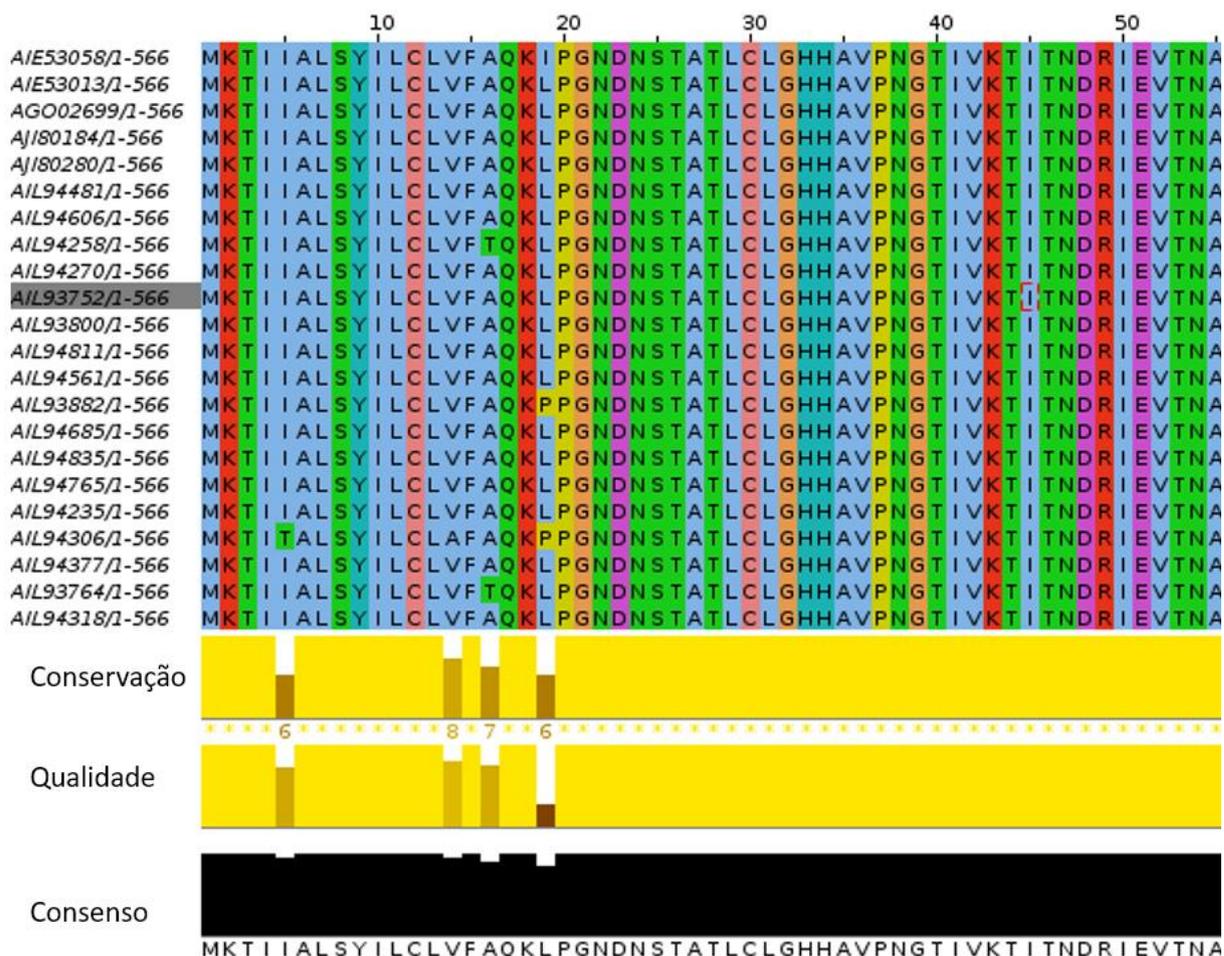
sequências e das sequências consenso, geradas para as proteínas H1 e H3, estão representadas nas figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 84 - Parte do alinhamento e sequência consenso de H1



Parte do alinhamento das 39 sequências proteicas de H1 recuperadas no Influenza Virus Database, referentes aos vírus influenza A (H1N1)pdm09 que circularam nas américas durante os anos de 2013 e 2014, e sequência consenso montada a partir do alinhamento. Fonte: imagem adaptada do programa Jalview.

Figura 15 - Parte do alinhamento e sequência consenso de H3



Parte do alinhamento das 22 sequências proteicas de H3 recuperadas no Influenza Virus Database, referentes aos vírus influenza A H3N2 que circularam nas américas durante os anos de 2013 e 2014, e sequência consenso montada a partir do alinhamento. Fonte: imagem adaptada do programa Jalview.

As sequências consenso geradas foram traduzidas e comparadas com sequências nucleotídicas de H1 e H3, e assim foram escolhidas as sequências gênicas, representadas nas figuras 16 e 17, para produção das proteínas recombinantes.

Figura 96 - Sequência gênica de H1

Sequência gênica de H1:

```

1   GATACGCTGT GCATCGGCTA CCACGCAAAC AACTCAACGG ATACGGTCGA TACGGTTCTG
61  GAAAAAATG TCACGGTCAC CCACTCAGTT AACCTGCTGG AAGATAAACA TAATGGCAAA
121 CTGTGCAAAC TGCCTGGTGT CGCACCGCTG CACCTGGGTA AATGCAACAT CGCCGGCTGG
181 ATTCTGGGTA ATCCGGAATG TGAATCGCTG AGCACCGCCA GCTCTTGGTC TTATATCGTC
241 GAAACCAGTT CCTCAGATAA CGGCACGTGC TATCCGGGTG ACTTCATTAA TTACGAAGAA
301 CTGCGTGAAC AGCTGTCGAG CGTTTCTAGT TTTGAACGCT TCGAAATCTT TCCGAAAACC
361 AGCTCATGGC CGAACCATGA TAGCAATAAA GGTGTGACGG CAGCATGTCC GCACGCAGGT
421 GCAAAATCCT TCTACAAAAA CCTGATCTGG CTGGTTAAAA AAGGCAACTC ATACCCGAAA
481 CTGTCTCAGA GTTACATCAA CGATAAGGGT AAAGAAGTCC TGGTGCTGTG GGGCATTTCAT
541 CACCCGTCCA CCACGGCGGA TCAGCAATCA CTGTATCAA ATGCAGACGC TTACGTTTTTC
601 GTCGGTACCA GCCGTTATAG CAAAAAATTT AAACCGGAAA TCGCCATTCG TCCGAAAGTT
661 CGCGATCAGG AAGGCCGCAT GAACTATTAC TGGACCCTGG TCGAACCGGG TGACAAAATT
721 ACCTTCGAAG CAACGGGCAA CCTGGTGGTT CCGCGTTACG CATTTACCAT GGAACGCAAT
781 GCTGGCTCTG GTATTATCAT TAGTGATACG CCGGTGCATG ACTGCAACAC CACGTGTCAG
841 ACCCCGGAAG GCGCTATCAA CACGTGCTG CCGTTCCAAA ATATTCACCC GATCACCATT
901 GGTAATGCC CGAAATATGT GAAAAGCACC AACTGCGTC TGGCAACGGG CCTGCGCAAT
961 GTTCCGTCGA TCCAGAGCCG TGGCCTGTTC GGTGCAATCG CAGGTTTTAT TGAAGGCGGT
1021 TGGACCGGCA TGGTGGATGG CTGGTATGGT TACCATCACC AGAACGAACA AGGCTCGGGT
1081 TACGCAGCTG ATCTGAAAAG CACCCAGAAT GCAATCGACA AAATCACGAA CAAAGTGAAC
1141 AGCGTTATCG AAAAAATGAA CACCCAATTC ACGGCTGTTG GTAAAGAATT CAACCATCTG
1201 GAAAAACGCA TCGAAAACCT GAATAAAAAA GTCGATGACG GCTTTCTGGA TATTTGGACC
1261 TATAACGCCG AACTGCTGGT GCTGCTGGAA AATGAACGTA CGCTGGATTA TCATGACAGT
1321 AACGTCAAAA ATCTGTACGA AAAAGTGCGC AACCAGCTGA AAAACAATGC GAAAGAAATT
1381 GGCAATGGTT GTTTCGAATT CTACCACAAA TGCGATAACA CCTGTATGGA ATCTGTGAAA
1441 AATGGCACGT ATGACTACCC GAAATACAGT GAAGAAGCGA AACTGAATCG TGAAAAAATC
1501 GACGGCGTGA AACTGGAAAG CACCCGCATC TATCAAATC

```

Sequência nucleotídica referente à sequência consenso da proteína recombinante H1, obtida através de tradução reversa e comparação com sequências disponíveis no banco de dados genômicos do NCBI, provenientes do vírus influenza A (H1N1)pdm09. Fonte: imagem elaborada pela autora.

Figura 107 - Sequência gênica de H3

Sequência gênica de H3:

```

1      CAAAACTGC CGGGTAACGA TAACTCCACC GCCACGCTGT GCCTGGGTCA CCACGCCGTC
61     CCGAACGGTA CGATTGTCAA AACCATTACC AACGATCGCA TTGAAGTGAC CAATGCGACG
121    GAACTGGTTC AGAACAGCTC TATTGGTGAA ATCTGCGATA GTCCGCATCA AATTCTGGAC
181    GGCGAAAATT GTACCCTGAT CGATGCACTG CTGGGCGATC CGCAGTGCGA CGGTTTTTCAA
241    AATAAAAAAT GGGACCTGTT CGTCGAACGC TCAAAAGCCT ATTCGAACTG TTATCCGTAC
301    GATGTTCCGG ACTACGCGAG CCTGCGTTCT CTGGTCGCCA GTTCCGGTAC CCTGGAATTT
361    AACAAATGAAT CCTTCAATTG GGCAGGCGTT ACCCAGAACG GCACGTCATC GGCTTGCATT
421    CGCGGCAGTA ATAGCAGCTT TTTCAGCCGT CTGAACTGGC TGACCCACCT GAATTTTAAA
481    TATCCGGCCC TGAACGTTAC GATGCCGAAC AATGAACAGT TCGATAAACT GTACATTTGG
541    GGCCTCCATC ACCCGGGTAC CGATAAAGAC CAGATTTTTT TGTATGCACA AAGTTCCGGT
601    CGCATCACCG TCAGCACGAA ACGTTCTCAG CAAGCTGTGA TTCCGAATAT CGGCAGCCGT
661    CCGCGCATTC GTAACATCCC GAGTCGCATT TCCATCTACT GGACCATTGT GAAACCGGGT
721    GATATTCTGC TGATCAACTC TACGGGCAAT CTGATCGCAC CGCGCGGTTA TTTTAAAATC
781    CGTTCAGGCA AATCATCGAT TATGCGTTCG GATGCTCCGA TCGGTAAATG CAAAAGCGAA
841    TGTATCACCC CGAACGGCTC TATTCCGAAT GACAAACCGT TCCAGAACGT CAATCGCATT
901    ACGTATGGTG CGTGTCCGCG TTACGTGAAA CAAAGCACCC TGAAACTGGC CACGGGCATG
961    CGCAACGTGC CGGAAAAACA GACCCGTGGC ATTTTTGGTG CGATCGCCGG TTTTATTGAA
1021   AATGGCTGGG AGGGTATGGT TGATGGCTGG TATGGTTTTT GCCATCAGAA CAGTGAAGGC
1081   CGTGGTCAAG CGGCCGATCT GAAATCCACC CAGGCAGCTA TTGACCAAAT CAACGGTAAA
1141   CTGAATCGCC TGATTGGCAA AACGAACGAA AAATTCACC AGATCGAAAA AGAATTCAGC
1201   GAAGTGGAAG GCCGTATCCA AGATCTGGAA AAATACGTTG AAGATACCAA AATCGACCTG
1261   TGGTCATACA ATGCAGAACT GCTGGTTGCG CTGGAAAACC AGCATACCAT TGATCTGACG
1321   GACTCGGAAA TGAACAAACT GTTCGAAAAA ACCAAAAAAC AGCTGCGTGA AAACGCGGAA
1381   GATATGGGCA ATGGTTGCTT CAAAATCTAT CATAAATGCG ACAATGCCTG TATTGGCAGC
1441   ATCCGCAACG GCACGTATGA TCACGACGTT TACCGTGATG AAGCACTGAA TAATCGTTTC
1501   CAAATCAAAG GTGTCGAACT GAAATCGGGC TACAAAGAT

```

Sequência nucleotídica referente à sequência consenso da proteína recombinante H3, obtida através de tradução reversa e comparação com sequências disponíveis no banco de dados genômicos do NCBI, provenientes do vírus influenza A H3N2. Fonte: imagem elaborada pela autora.

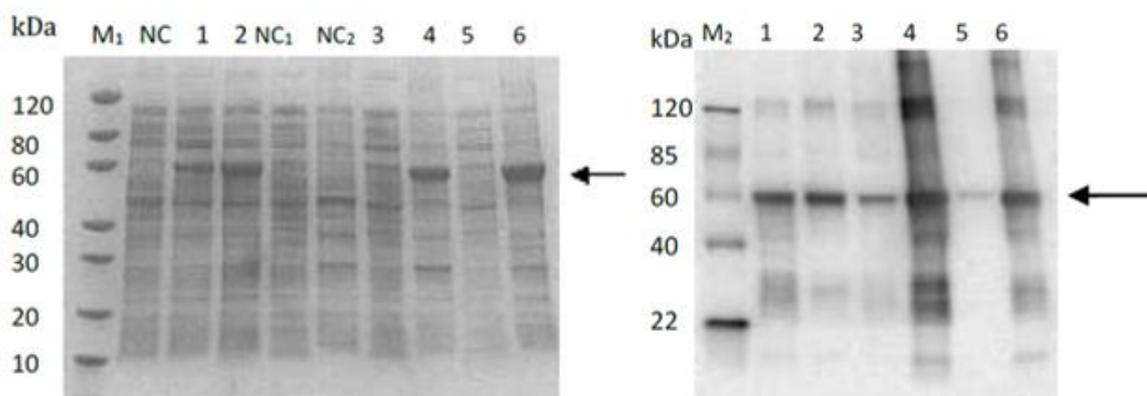
As sequências gênicas obtidas ao final da tradução reversa foram sintetizadas para vetores pET30a e subclonadas com sucesso pela empresa GenScript® (Piscataway, EUA), sob nossa supervisão.

5.1.2 Expressão, purificação e solubilização das proteínas H1 e H3

5.1.2.1 Expressão, purificação e solubilização da proteína H1

A transformação da linhagem de bactérias *E.coli* SHuffle com o vetor de expressão pET30a-H1 foi realizada com sucesso e a expressão das proteínas foi induzida por IPTG. SDS-PAGE e Western blot foram utilizados para monitorar a expressão, conforme demonstrado na Figura 18.

Figura 11 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His, da expressão da proteína recombinante H1

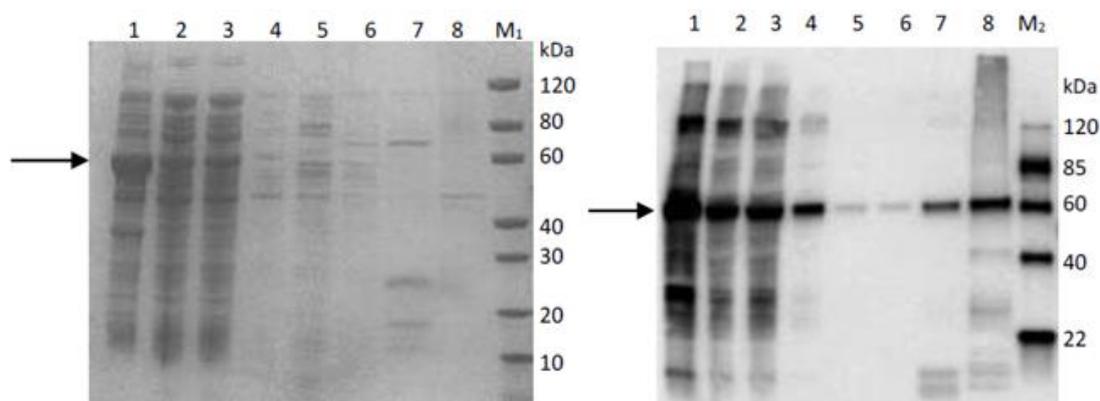


Fotos da análise da expressão de H1, por SDS-PAGE (esquerda) e Western blot (direita). As fileiras correspondem ao: marcador proteico (fileira M1), marcador de Western blot (fileira M2), lisado celular sem indução por IPTG (fileira NC), lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira 1), lisado celular com indução por 4 horas a 37°C (fileira 2), sobrenadante do lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira NC1), pellet do lisado celular não induzido (fileira NC2), sobrenadante do lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira 3), pellet do lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira 4), sobrenadante do lisado celular com indução por 4 horas a 37°C (fileira 5), e pellet do lisado celular com indução por 4 horas a 37°C (fileira 6). As setas indicam a banda correspondente à proteína de interesse, que possui um peso esperado de aproximadamente 60Kd.

Foi possível observar, através da análise do SDS-PAGE e do *Western blot*, que a melhor estratégia para expressão proteica para H1 foi a de indução com IPTG durante um período de 16 horas a 15°C e essa foi a metodologia adotada para a produção do estoque da proteína H1.

As frações do precipitado e do sobrenadante do lisado celular das culturas utilizadas para expressão, foram purificadas em colunas de níquel, sendo feitas eluições com gradiente de imidazol e tris. As eluições obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blot*, conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 129 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His, da purificação da proteína recombinante H1



Fotos da análise da purificação das proteínas H1, após a expressão, por SDS-PAGE (esquerda) e Western blot (direita). As fileiras correspondem ao: marcador proteico (fileira M1), marcador de Western blot (fileira M2), precipitado do lisado celular (fileira 1), sobrenadante do lisado celular (fileira 2), flow through (fileira 3), lavado com 50mM de Tris (fileira 4), lavado com 20mM de imidazol (fileira 5), lavado com 50mM de imidazol (fileira 6), lavado com 500mM de imidazol (fileira 7) e resina de níquel após a eluição (fileira 8). As setas indicam a banda correspondente à proteína de interesse, que possui um peso esperado de aproximadamente 60Kd.

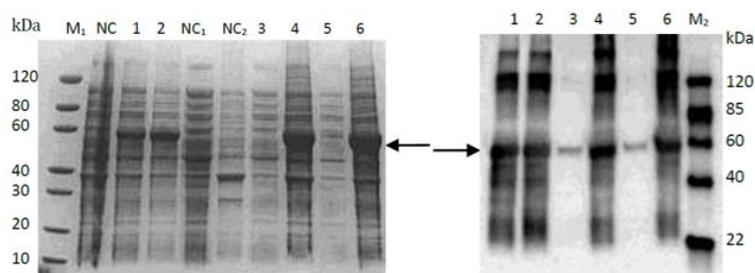
Após a purificação, foi possível observar, através da análise do SDS-PAGE e do Western blot, que grande parte da proteína-alvo estava expressa na fração insolúvel (fileira 1), e após a purificação do sobrenadante nenhuma banda da proteína recombinante foi detectada por SDS-PAGE (fileiras 4, 5, 6 e 7).

Devido às dificuldades encontradas na expressão da proteína recombinante H1 solúvel em quantidades apropriadas na fração do sobrenadante do lisado celular, com as abordagens empregadas, foi realizada a estratégia de *refolding* das proteínas, e essa estratégia se mostrou apropriada pois resultou em um maior rendimento da proteína recombinante. Com emprego dessa metodologia, foi possível obter maior rendimento, cerca de 1 mL, de proteína H1 em uma concentração de 0,9 µg/mL. A partir dessa metodologia foi produzido o estoque de proteína H1 utilizado nos ensaios de reatividade realizados por ELISA.

5.1.2.2 Expressão, purificação e solubilização da proteína H3

A transformação da linhagem de bactérias *E.coli* BL21 (DE3) com o vetor de expressão pET30a-H3 foi realizada com sucesso e a expressão das proteínas foi induzida por IPTG. SDS-PAGE e Western blot foram utilizados para monitorar a expressão, conforme demonstrado na Figura 20.

Figura 130 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His, da expressão da proteína recombinante H3

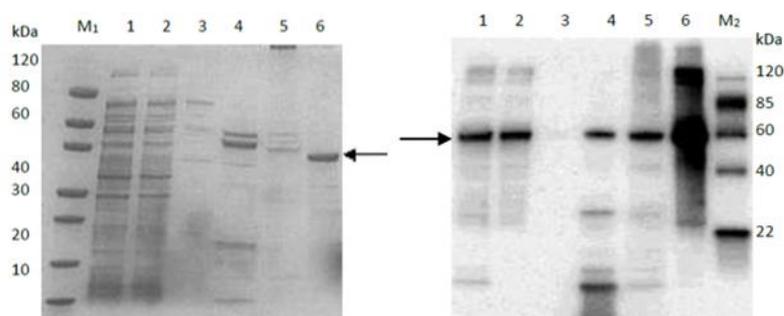


Fotos da análise da expressão de H3, por SDS-PAGE (esquerda) e Western blot (direita). As fileiras correspondem ao: marcador proteico (fileira M1), marcador de Western blot (fileira M2), lisado celular sem indução por IPTG (fileira NC), lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira 1), lisado celular com indução por 4 horas a 37°C (fileira 2), sobrenadante do lisado não induzido (fileira NC1), pellet do lisado celular não induzido (fileira NC2), sobrenadante do lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira 3), pellet do lisado celular com indução por 16 horas a 15°C (fileira 4), sobrenadante do lisado celular com indução por 4 horas a 37°C (fileira 5), e pellet do lisado celular com indução por 4 horas a 37°C (fileira 6). As setas indicam a banda correspondente à proteína de interesse, que possui um peso esperado de aproximadamente 60Kd.

Foi possível observar, através da análise do SDS-PAGE e do Western blot, que a melhor estratégia para expressão proteica para H3 foi a de indução com IPTG durante um período de 4 horas a 37°C, e essa foi a metodologia adotada para a produção do estoque da proteína H3.

As frações do precipitado e do sobrenadante do lisado celular das culturas utilizadas para a expressão, foram purificadas através do uso de colunas de níquel sendo feitas eluições com gradiente de imidazol. As eluições obtidas das frações foram analisadas por SDS-PAGE e Western blot (Figura 21).

Figura 141 - Análise por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo anti-His da purificação da proteína recombinante H3



Fotos da análise da purificação das proteínas H3, após a expressão, por SDS-PAGE (esquerda) e Western blot (direita). As fileiras correspondem ao: marcador proteico (fileira M1), marcador de Western blot (fileira M2), sobrenadante do lisado celular (fileira 1), flow through (fileira 2), lavado com 20mM de imidazol (fileira 3), lavado com 500mM de imidazol (fileira 4), resina de níquel após a eluição (fileira 5)

e precipitado do lisado celular (fileira 6). As setas indicam a banda correspondente à proteína de interesse, que possui um peso esperado de aproximadamente 60Kd.

Após a purificação, foi possível observar, através da análise do SDS-PAGE e do Western blot, que grande parte da proteína recombinante H3 estava expressada na fração insolúvel (fileira 6), e após a purificação do sobrenadante nenhuma banda da proteína recombinante foi detectada por SDS-PAGE nessa fração (fileiras 3 e 4).

Devido às dificuldades encontradas na expressão da proteína recombinante H3 solúvel em quantidades apropriadas na fração do sobrenadante do lisado celular, com as abordagens empregadas, foi realizada a estratégia de *refolding* das proteínas, e essa estratégia se mostrou apropriada pois resultou em um maior rendimento da proteína recombinante. Com emprego dessa metodologia foi possível obter maior rendimento, cerca de 1 mL, de proteína H3 em uma concentração de 0,9 µg/mL. A partir dessa metodologia foi produzido o estoque de proteína H3 utilizado nos ensaios de reatividade realizados por ELISA.

5.2 Ensaio imunoenzimático para avaliação da reatividade contra H1 e H3

5.2.1 Estabelecimento do ensaio imunoenzimático para avaliação da reatividade contra H1 e H3

Para a estabelecimento do ensaio de ELISA foram utilizados pools de 10 amostras sabidamente soropositivas e soronegativas para influenza A (H1N1)pdm09, provenientes de indivíduos não-vacinados e vacinados contra esse tipo de influenza, até o ano de 2010. Foram testadas diferentes concentrações para os antígenos, para os pools de amostras a serem testados e para o anticorpo conjugado (dados não mostrados e que serão detalhadamente descritos na patente do ensaio).

Através desses testes foram determinadas as concentrações adequadas para as proteínas H1 e H3 de 125ng/ml, e os fatores de diluição adequados para as amostras e para os anticorpos conjugados de 1:50 e 1:1000, respectivamente. A partir do protocolo de ELISA estabelecido, foi possível obter um ensaio apresentando eficiência e acurácia adequadas e melhor rendimento dos reagentes utilizados.

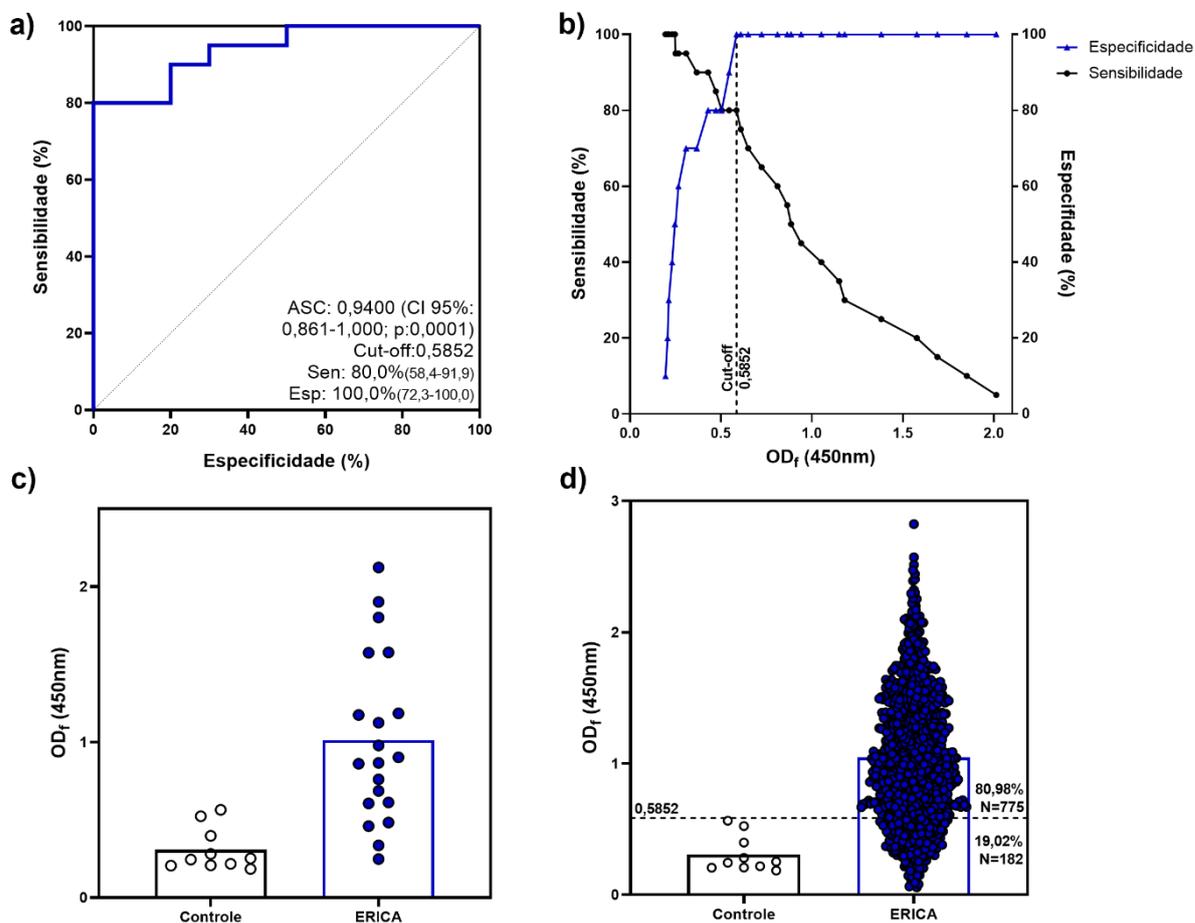
5.2.2 Análise dos resultados do perfil de reatividade da população do estudo contra H1 e H3

Após o estabelecimento dos ensaios de ELISA para as proteínas H1 e H3, foram testadas, efetivamente, as amostras do estudo e do grupo controle. Ao final do processamento das amostras foram obtidos valores de DO para cada uma delas e a partir desses valores foram calculados os valores de DO_r , utilizados nas análises de definição do ponto de corte e na avaliação do perfil de reatividade da população estudada.

A determinação dos pontos de corte dos ensaios, para cada uma das proteínas, foi realizada através da formulação e análise de curvas ROC e TG-ROC, buscando o equilíbrio entre os valores de especificidade, sensibilidade e área sob a curva obtidos. Foram determinados os valores de 0,5852 e 0,4101 como pontos de corte para as proteínas H1 e H3, respectivamente.

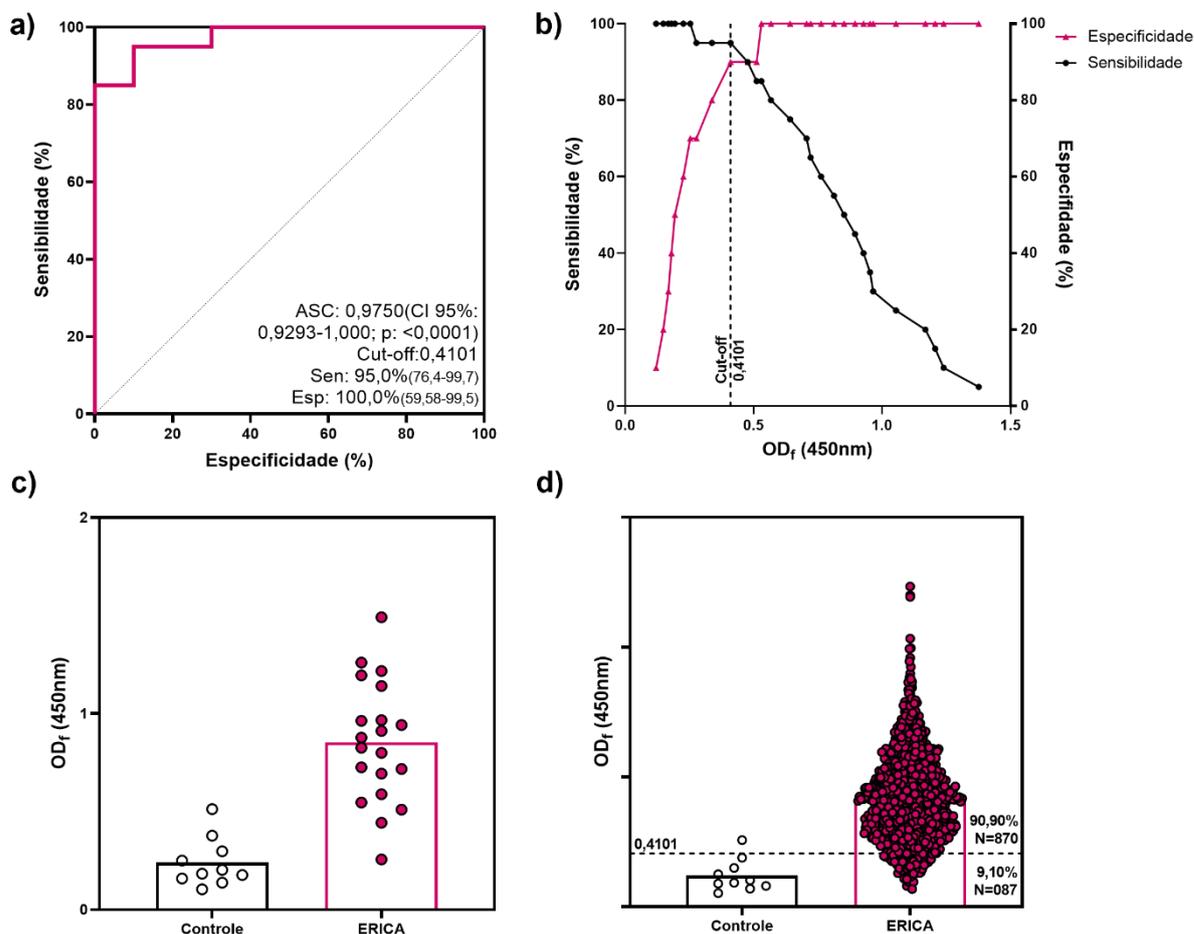
As curvas geradas para cada uma das proteínas e os resultados obtidos das análises do perfil de reatividade dos adolescentes e do grupo controle estão representados nas Figuras 22 e 23, para as proteínas H1 e H3, respectivamente.

Figura 152 - Obtenção do ponto de corte para os ensaios de ELISA e resultados do perfil de reatividade para a proteína H1



(a) Curva ROC construída a partir da representação gráfica da sensibilidade no eixo vertical, e especificidade no eixo horizontal. Os resultados foram determinados pela área sob a curva (ASC) e a partir dos valores de sensibilidade e especificidade, obtidos pela curva, foi gerada a (b) curva TGROC, e definido o valor de ponto de corte igual a 0,5852. (c) Gráfico de dispersão demonstrando o perfil individual de reatividade (bolaz preenchidas azuis), representado pelo valor de DO_f (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) das amostras do grupo controle (sabidamente negativas para influenza (H1N1)pdm09) (n=010) e de 20 amostras selecionadas aleatoriamente entre os adolescentes do projeto ERICA, usados para a construção da curva ROC. (d) Gráfico de dispersão demonstrando o perfil individual de reatividade (bolaz preenchidas azuis), representado pelo valor de DO_f (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) das amostras do grupo controle (sabidamente negativas para influenza (H1N1)pdm09) (n=010) e dos adolescentes do projeto ERICA (n=957). A linha tracejada representa o ponto de corte determinado. As barras representam os valores médios encontrados para os grupos avaliados. Os gráficos foram construídos no software GraphPadPrism v.8.0.2 (GraphPad Software, California, USA).

Figura 163 - Obtenção do ponto de corte para os ensaios de ELISA e resultados do perfil de reatividade para a proteína H3.



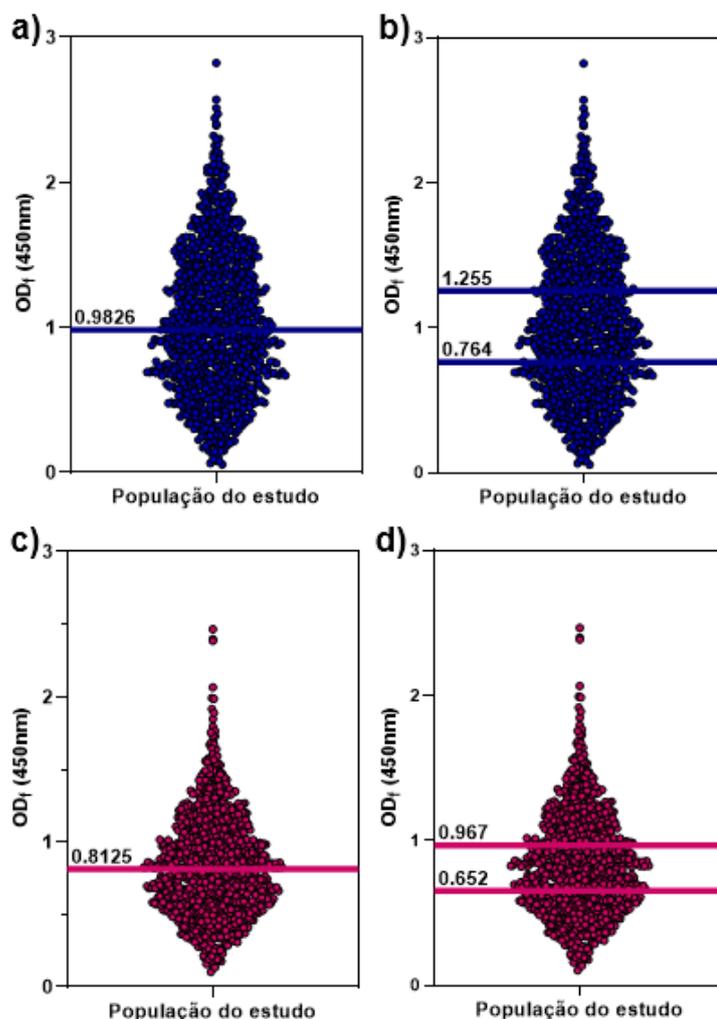
(a) Curva ROC construída a partir da representação gráfica da sensibilidade no eixo vertical, e especificidade no eixo horizontal. Os resultados foram determinados pela área sob a curva (ASC) e a partir dos valores de sensibilidade e especificidade, obtidos pela curva, foi gerada a (b) curva TGROC, e definido o valor de ponto de corte igual a 0,4101. (c) Gráfico de dispersão demonstrando o perfil individual de reatividade (bolas preenchidas em rosa), representado pelo valor de DO_f, (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) das amostras do grupo controle (sabidamente negativas para influenza (H1N1)pdm09) (n=010) e de 20 amostras selecionadas aleatoriamente entre os adolescentes do projeto ERICA, usados para a construção da curva ROC. (d) Gráfico de dispersão demonstrando o perfil individual de reatividade (bolas preenchidas em rosa), representado pelo valor de DO_f, (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) das amostras do grupo controle (sabidamente negativas para influenza (H1N1)pdm09) (n=010) e dos adolescentes do projeto ERICA (n=957). A linha tracejada representa o ponto de corte determinado. As barras representam os valores médios encontrados para os grupos avaliados. Os gráficos foram construídos no software GraphPadPrism v.8.0.2 (GraphPad Software, California, USA).

Em relação ao perfil de reatividade da população de adolescentes contra as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza, de forma geral, foi possível observar que a distribuição dos valores de DO_f, referentes à reatividade de cada uma das amostras,

se apresentou de maneira homogênea para as duas proteínas, embora a dispersão dos valores de DO_f para a proteína H1 seja ligeiramente maior do que a encontrada para a proteína H3. Considerando os valores de ponto de corte determinados, foi encontrada uma taxa de soropositividade de 80,98% entre os adolescentes para a proteína H1 e 90,90% entre os adolescentes para a proteína H3.

Os resultados obtidos a partir das análises complementares feitas para H1 e H3 de assinaturas com base na mediana global e com base nos valores globais de tercís da população do estudo estão representados na Figura 24.

Figura 24 - Gráficos de dispersão demonstrando a distribuição dos valores de DO_f da população do estudo para H1 e H3, de acordo com os valores de mediana e tercís globais



(a) Gráfico de dispersão demonstrando a distribuição dos valores de DO_f (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) referentes à reatividade de cada participante do estudo (bolas preenchidas azuis) ($n=967$), contra as proteínas H1. A linha em azul representa o valor de mediana global obtido. Participantes com valores acima da mediana global são considerados altos

produtores de reatividade e participantes com valores abaixo da mediana global são considerados baixos produtores de reatividade. (b) Gráfico de dispersão demonstrando a distribuição dos valores de DO_f (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) referentes à reatividade de cada participante do estudo (bolas preenchidas azuis) (n=967), contra as proteínas H1. As linhas em azul representam os valores de tercís (33,3%) obtidos. Participantes com valores compreendidos até o primeiro tercil, entre o primeiro e o segundo, e após o terceiro tercil são considerados baixos, intermediários e altos produtores de reatividade, respectivamente. (c) Gráfico de dispersão demonstrando a distribuição dos valores de DO_f (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) referentes à reatividade de cada participante do estudo (bolas preenchidas vermelhas) (n=967), contra as proteínas H3. A linha em vermelho representa o valor de mediana global obtido. Participantes com valores acima da mediana global são considerados altos produtores de reatividade e participantes com valores abaixo da mediana global são considerados baixos produtores de reatividade. (d) Gráfico de dispersão demonstrando a distribuição dos valores de DO_f (DO_f = Valor de DO da amostra - Média dos valores de DO dos brancos) referentes à reatividade de cada participante do estudo (bolas preenchidas vermelhas) (n=967), contra as proteínas H3. As linhas em vermelho representam os valores de tercís (33,3%) obtidos. Participantes com valores compreendidos até o primeiro tercil, entre o primeiro e o segundo, e após o terceiro tercil são considerados baixos, intermediários e altos produtores de reatividade, respectivamente. Os gráficos foram construídos com o auxílio do software GraphPadPrism v.8.0.2 (GraphPad Software, California, USA).

Em relação às análises feitas a partir dos parâmetros complementares avaliados para a população global do estudo, foi possível observar que, novamente, a distribuição dos valores de DO_f referentes à reatividade de cada uma das amostras se apresentou de maneira homogênea e similar para as proteínas H1 e H3, embora uma faixa de variação ligeiramente maior dos valores de DO_f tenha sido encontrada para a proteína H1 em comparação à faixa de variação encontrada para os valores da proteína H3. Além disso, foi encontrada uma correlação fraca positiva entre os resultados de reatividade para H1 e H3 ($r=0,2781$ e $p\text{-value} < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o perfil de reatividade de escolares do Rio Grande do Sul contra as proteínas H1 e H3. Para isso, amostras de soro de adolescentes entre 12 e 17 anos, que frequentavam escolas na cidade de Porto Alegre, foram testadas para detecção de reatividade mediada por anticorpos IgG específicos contra as proteínas H1 e H3, referente às amostras virais de influenza (H1N1)pdm09 e H3N2 que circulam mundialmente de maneira sazonal há ao menos uma década e que também circularam na América do Sul, durante 2013 e 2014, período em que foram feitas as coletas das amostras para o estudo atual.

A metodologia empregada para a detecção da reatividade foi um ensaio sorológico imunoenzimático indireto, no qual os antígenos, utilizados para verificar a presença de anticorpos nas amostras testadas, consistiram em proteínas

recombinantes produzidas a partir de sequências consenso de proteínas H1 e H3, referentes especificamente às amostras virais que circularam na América do Sul nos anos das coletas das amostras.

Existem no mercado diversos kits comerciais de ensaios sorológicos para a detecção de proteínas dos vírus influenza, entretanto, grande parte desses ensaios utiliza como antígenos proteínas conservadas entre os diferentes tipos e subtipos virais, como nucleoproteínas e proteínas de matriz M1, o que permite uma detecção geral da reatividade contra os vírus influenza em amostras de soro (KATZ; HANCOCK; XU, 2011; DWYER et al, 2006; VEMULA et al, 2016). Essa abordagem pode ocasionar uma subestimação da reatividade produzida contra aquela amostra devido à variabilidade antigênica existente dentro de uma mesma amostra viral (KATZ; HANCOCK; XU, 2011; DWYER et al, 2006; VEMULA et al, 2016). Porém, o uso de antígenos de alta variabilidade entre os vírus influenza, como os descritos nesse trabalho, proporciona a detecção de anticorpos produzidos especificamente para os subtipos e amostras virais de interesse, diminuindo assim o risco de superestimação da reatividade encontrada para essas amostras virais na população.

De maneira geral, a metodologia empregada no presente estudo demonstrou índices de desempenho apropriados para análise das taxas de soropositividade de adolescentes escolares do Rio Grande do Sul contra proteínas H1 e H3 específicas das amostras virais circulantes entre 2013 e 2014, e a reatividade encontrada foi elevada para ambas.

Considerando (1) a alta incidência de influenza no Brasil e no Rio Grande do Sul, durante 2013 e 2014, especialmente os subtipos (H1N1)pdm09 e H3N2 (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015; SES-RS, 2014; SES-RS, 2015); (2) o fato de adolescentes conviverem grande parte do dia em ambiente escolar, local onde há comprovadamente maior disseminação de vírus respiratórios (WHO, 2019; FRANCIS; KING; KELVIN, 2019; SAUERBREI et al, 2009; SAUERBREI et al, 2014); e (3) o fato das infecções causadas pelos influenza induzirem principalmente uma resposta imune mediada por anticorpos contra a HA, era esperado que uma parte considerável da população avaliada no presente estudo apresentasse algum nível de reatividade contra essas proteínas virais.

Os resultados obtidos aqui demonstraram que grande parte da população de adolescentes escolares de Porto Alegre, avaliada nesse estudo, possui anticorpos contra os subtipos de influenza A, (H1N1)pdm09 e H3N2. Foi observada uma taxa de soropositividade geral entre os adolescentes de 80,98% para a proteína H1 e 90,90% para a proteína H3. Além disso, com base nos históricos de circulação dos vírus influenza do tipo A mundialmente, isto é, do menor período de circulação dos vírus (H1N1)pdm09, em comparação com os vírus H3N2, também era esperado que o perfil geral de resposta dos adolescentes fosse maior para o último subtipo viral, uma vez que a população do estudo esteve em contato com esses vírus por mais tempo ao longo das últimas décadas (FRANCIS; KING; KELVIN, 2019).

Apesar de não terem sido obtidas informações acerca do histórico vacinal dos adolescentes, uma vez que o protocolo de vacinação brasileiro não recomenda a vacinação de indivíduos dessa faixa etária (BRASIL, 2019a; BRASIL, 2010), a reatividade detectada nos participantes desse estudo contra as proteínas testadas, muito provavelmente se deve ao contato destes com amostras virais circulantes naquele período, ou a resposta antigênica cruzada, apesar dos resultados de especificidade encontrados nos ensaios para ambas as proteínas terem sido de 100% e desse tipo de resposta ser menos frequente entre os vírus influenza, devido à sua alta variabilidade antigênica (KRAMMER et al, 2018).

As elevadas taxas de soropositividade contra H1 e H3 observadas na população de adolescentes avaliada no presente estudo corroboram com dados publicados por outros países, como Alemanha, Japão e Holanda, nos quais também foram encontrados níveis de soroprevalência de anticorpos contra vírus influenza A entre 80 e 100% em populações jovens (SAUERBREI et al, 2009; SAURBREI et al, 2014; BODOWES et al, 2011; IWATSUKI-HORIMOTO et al, 2011).

Um estudo realizado na Alemanha com amostras coletadas de 1.111 crianças e adolescentes, entre 1999 e 2006, obteve, por meio de ensaios de ELISA para a detecção de anticorpos contra H3N2, um perfil global de soroprevalência de 82%. Ao analisar a faixa etária equivalente à avaliada no presente estudo, a soroprevalência chegou a 100%, resultado que se aproxima consideravelmente ao encontrado no estudo com adolescentes do ERICA (SAUERBREI et al, 2009). Além desse, um

segundo estudo realizado na Alemanha com 1.029 crianças e adolescentes não vacinados contra influenza, detectou entre 2008 e 2010, utilizando ELISA para detecção de anticorpos contra influenza A, uma soroprevalência global de 87,6%, e mais um vez quando analisada a faixa etária equivalente à avaliada no presente estudo, foi encontrada uma soroprevalência de 100% (SAURBREI et al, 2014).

Na Holanda, um estudo realizado entre 1999 e 2007 buscou avaliar a soroprevalência de anticorpos em 720 crianças contra os vírus influenza do tipo A H1N1 e H3N2, através do uso de ensaios de inibição da hemaglutinação. Os resultados obtidos por eles demonstraram que, em crianças mais velhas, com idade aproximada de 7 anos, a taxa de soroprevalência contra vírus influenza A H3N2 chegou a 100%, e para os vírus do subtipo H1N1 chegou a 77%, mesmo antes da introdução dos vírus (H1N1)pdm09 na população mundial. Ao final do estudo, foi observado que todas as crianças acima de 6 anos avaliadas possuíam anticorpos contra ao menos um subtipo de influenza A. Porém, em geral, houve um predomínio na reatividade contra os vírus influenza H3N2, de maneira semelhante à observada no presente estudo, o que pode ser explicado pelo fato desse subtipo viral estar circulando na população mundial de maneira mais estável nas últimas décadas, quando comparado ao (H1N1)pdm09 (BODEWES et al, 2011).

É interessante ressaltar que para os estudos realizados na Alemanha e na Holanda, as informações acerca do histórico vacinal dos participantes não foram obtidas. Porém, a vacinação de crianças e adolescentes contra influenza nesses países é recomendada apenas para aquelas que compõem algum grupo de risco, podendo ser assumida, portanto, uma taxa de apenas 15-20% de cobertura vacinal entre os indivíduos avaliados nesses estudos (VON KRIES et al, 2011).

Entre 2009 e 2010 foi realizado no Japão um estudo com 79 crianças escolares e 133 adultos não vacinados contra influenza, que foram testados através de ensaios de neutralização viral, quanto à presença de anticorpos neutralizantes contra vírus influenza do subtipo (H1N1)pdm09. As amostras coletadas durante e após o período pandêmico resultaram em um perfil geral de soropositividade de 89,5% na população infantil, sendo essa taxa significativamente maior do que a encontrada entre os adultos (20%), o que reflete mais uma vez o maior impacto causado pelas infecções por

influenza em populações mais jovens, em especial populações escolares (IWATSUKI-HORIMOTO et al, 2011).

Além dos estudos supracitados, outros dois também foram realizados em países de clima temperado, porém, nesses estudos foram observadas soroprevalência mais baixas. Dois estudos foram realizados na Inglaterra, entre 2008 e 2011, utilizando ensaios de inibição da hemaglutinação e de microneutralização viral, e avaliaram populações de diferentes faixas etárias quanto à prevalência de anticorpos contra os vírus influenza (H1N1)pdm09. Nos dois estudos foi observada, assim como nos demais trabalhos aqui citados, uma maior soroprevalência nas populações de crianças e adolescentes, quando comparada à população geral, sendo relatadas taxas de soroprevalência entre 58% e 83% para jovens e adolescentes (MILLERE et al, 2010; HOSCHLER et al, 2012).

Em geral, os trabalhos realizados em países de clima temperado revelam a presença de taxas mais elevadas de soroprevalência contra os vírus influenza na população geral. Esses dados corroboram com a estimativa global de que as infecções por influenza ocorrem de maneira mais intensa em países onde as estações climáticas são mais bem definidas (WHO, 2019; CDC, 2020a).

Foram encontrados na literatura menos estudos epidemiológicos voltados para influenza, realizados em países de climas mais quentes, e em geral, os perfis de soroprevalência relatados tiveram maior divergência entre si (MCVERNON et al, 2013; ALSUWAIDI et al, 2017; SAM et al, 2013; ELIZONDO-MONTEMAYOR et al, 2011). Algumas das possíveis explicações para as diferenças observadas são: (1) a existência de diferenças nos padrões de transmissão dos vírus influenza entre essas regiões; (2) possíveis diferenças existentes entre as respostas imunes desencadeadas em diferentes populações; (3) menores taxas de deslocamento entre os indivíduos de determinadas populações, o que desfavorece a circulação de influenza; e (3) diferenças nas metodológicas utilizadas, que poderiam favorecer a sub ou superestimação da incidência dos vírus influenza em determinadas regiões (BEDFORD et al, 2015).

Em um estudo realizado na Austrália, com jovens e adultos, após o surto de influenza (H1N1)pdm09, foi observada, através do uso de ensaios de inibição da

hemaglutinação, uma taxa de soropositividade média global de 42% na população estudada. Entre os indivíduos mais jovens, a taxa de soroprevalência foi de 59%, demonstrando novamente maior soroprevalência contra influenza em populações jovens (MCVERNON et al, 2013).

Na Malásia, um trabalho realizado com amostras de crianças e adultos, coletadas entre 2008 e 2010, demonstrou, através do uso de ensaios de inibição da hemaglutinação, uma soroprevalência global de 21,9% para os vírus influenza A (H1N1)pdm09 e de 22,3% para H3N2. Mais uma vez foi observada maior taxa de soroprevalência em crianças e adolescentes, entre 5 e 17 anos, com uma média de soropositividade para (H1N1)pdm09 de 36% e para H3N2 de 51,9% (SAM et al, 2013).

Contrastando com os trabalhos descritos acima, um estudo realizado com crianças nos Emirados Árabes, entre 2014 e 2015, demonstrou, através do uso de ensaios de ELISA comerciais, para a detecção de anticorpos IgG específicos contra influenza do tipo A (não subtipados), uma taxa global de soropositividade de apenas 15,8%, sendo observadas maiores taxas de positividade entre adolescentes de aproximadamente 12 anos (ALSUWAIDI et al, 2017).

Por fim, um estudo realizado no México em 2009 com escolares, professores e servidores da área da saúde, observou, através do emprego de ensaios de ELISA comerciais para a detecção de anticorpos IgG específicos contra influenza A (H1N1)pdm09, uma soroprevalência global de 38,7% contra esses vírus, sendo a população de estudantes a responsável pela maior taxa de soroprevalência, correspondente a 47,3% (ELIZONDO-MONTEMAYOR et al, 2011).

Foi possível observar que, em geral, os trabalhos realizados em países de clima tropical e desértico, apresentam taxas menores de soroprevalência contra os vírus influenza na população geral, quando comparados aos trabalhos realizados em países de clima temperado. Esses dados também corroboram com a estimativa global de que infecções por influenza ocorrem de maneira menos intensa e homogênea em países onde as estações climáticas não são tão bem definidas (WHO, 2019; CDC, 2020a).

Apesar de ter sido avaliada no presente estudo apenas uma população de adolescentes, todos os estudos acima citados demonstram que, em geral, existem

diferenças nos perfis de resposta contra os vírus influenza do tipo A em grupos com diferentes faixas etárias, sendo observado um perfil de reatividade maior em crianças e adolescentes. Esses achados sugerem que indivíduos que estejam dentro da faixa etária de 12 a 15 anos, sejam mais afetados pelos vírus influenza A ou apresentem um perfil de resposta imune mediada por anticorpos mais pronunciado, quando comparado ao perfil de indivíduos de outras faixas etárias. Porém, ainda são necessários mais estudos em diferentes populações, que possam contribuir para a compreensão dos fatores relacionados às diferenças observadas nos perfis de resposta, entre as diferentes faixas etárias avaliadas até o momento.

No presente estudo, foram observadas taxas de soroprevalência contra os vírus influenza A, similares às obtidas em países de clima temperado e, apesar do Brasil ser um país considerado de clima tropical, devido à sua grande extensão territorial, algumas regiões possuem perfis de clima mais temperado, como a região sul do país, que abriga o estado do Rio Grande do Sul. Com isso, é possível que o perfil de circulação dos vírus influenza A nessas regiões siga a tendência observada em países de clima temperado, favorecendo assim uma maior incidência, e conseqüentemente, maior soroprevalência de anticorpos contra esses vírus, o que poderia explicar as taxas elevadas de soropositividade encontradas no presente estudo. Além disso, o fato da metodologia utilizada nesse trabalho ter sido adaptada para atender a população estudada, através do uso de antígenos específicos para as amostras virais circulantes na América do Sul durante o período de coleta das amostras, pode também ter sido um fator que favoreceu a obtenção de taxas de soropositividade mais elevadas, por se tratar de uma abordagem específica gerando portanto dados de reatividade mais precisos. Taxas similares de positividade foram obtidas em estudos realizados com populações similares (adolescentes e crianças escolares), que utilizaram metodologias semelhantes (ensaios imunoenzimáticos), e em regiões com perfis climáticos semelhantes (regiões temperadas), nas quais, em geral, há maior incidência de infecções por influenza, demonstrando assim que a estratégia de estudo escolhida para ser utilizada no presente trabalho foi adequada e suficiente para avaliação dos parâmetros aqui propostos. Além disso, as taxas de soropositividade encontradas nesse estudo estão de acordo com os principais subtipos virais

circulantes no Rio Grande do Sul, durante o período em que foram feitas as coletas, e com o histórico de circulação mundial de cada subtipo viral.

Os resultados obtidos a partir deste trabalho fornecem informações acerca do perfil de reatividade da população de adolescentes escolares do Rio Grande do sul, contra os vírus influenza (H1N1)pdm09 e H3N2. Assim como demonstrado por outros trabalhos, as elevadas taxas de soropositividade encontradas entre os escolares desse estudo, chamam a atenção para o fato de que essas populações podem estar mais expostas às infecções por esses vírus e as consequências potenciais dessas infecções, que a longo prazo podem trazer prejuízos a essa população. As informações geradas por esse estudo podem, portanto, auxiliar na tomada de decisões para a implementação de estratégias de controle e prevenção da influenza na região sul do Brasil.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo obteve, de forma pioneira, o perfil de soropositividade para influenza da população de adolescentes escolares da capital do Rio Grande do Sul, a partir da análise da reatividade desses indivíduos contra as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza que circularam na América do Sul entre 2013 e 2014. A metodologia empregada nesse estudo permitiu a construção de proteínas recombinantes H1 e H3 referentes às amostras virais de influenza circulantes na América do Sul entre 2013 e 2014 e o estabelecimento de um ensaio imunoenzimático utilizando tais proteínas como antígenos. Os dados demonstram taxas de soropositividade altas, de 80,98% e 90,90% respectivamente, para as proteínas H1 e H3 dos vírus influenza na população de adolescentes residentes no Rio Grande do Sul.

8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Como passos futuros, será feita a expansão das análises para os demais indivíduos de outros estados participantes da coorte de estudo do risco cardiovascular em adolescentes, focalizando no perfil encontrado em adolescentes do Rio de Janeiro. Posteriormente, pretendemos realizar a associação dos dados obtidos nesse estudo com outros parâmetros relacionados às doenças cardiovasculares, investigados pelo estudo ERICA, gerando informações que auxiliarão os gestores de saúde pública na

orientação de atividades preventivas para o vírus influenza, fornecendo subsídios para a tomada de decisões para políticas de saúde no Brasil. Por fim, pretendemos propor o desenvolvimento de um ensaio multiplex, com o uso de microesferas fluorescentes funcionais acopladas às proteínas H1 e H3 produzidas nesse trabalho, para avaliação da resposta de anticorpos IgG específicos contra essas proteínas, por citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSUWAIDI, Ahmed R. et al. Seroprevalence of influenza A and B viruses among unvaccinated children in the United Arab Emirates: a cross-sectional study. *BMC research notes*. 2017.

BAHADORAN, Azadeh et al. Immune responses to influenza virus and its correlation to age and inherited factors. *Frontiers in microbiology*. 2016.

BAILEY, Emily S. et al. The continual threat of influenza virus infections at the human–animal interface: What is new from a one health perspective?. *Evolution, medicine, and public health*. 2018.

BARNES, Michelle et al. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case–control studies. *Heart*, v. 101, n. 21, p. 1738-1747, 2015.

BEDFORD, Trevor et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*. 2015.

BLOCH, Katia Vergetti et al. The Study of Cardiovascular Risk in Adolescents–ERICA: rationale, design and sample characteristics of a national survey examining cardiovascular risk factor profile in Brazilian adolescents. *BMC public health*. 2015.

BODEWES, Rogier et al. Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands. *Clin. Vaccine Immunol*. 2011.

BOUVIER, Nicole M.; PALESE, Peter. *The biology of influenza viruses*. Vaccine. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Gripe (influenza): causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2019a. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/gripe>. Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico Operacional: Estratégia Nacional de Vacinação Contra o Vírus Influenza Pandêmico (H1N1) 2009. Brasília. 2010. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/22/informe-influenza-2009-2010-2011-220514.pdf>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de tratamento de Influenza: 2017. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/publicacoes/protocolo_tratamento_influenza_2017. Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 49 de 2019. *Bol Epidemiológico*. 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2013. *Bol Epidemiológico*. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2014. Bol Epidemiológico. 2015.

BROBERG, Eeva; NICOLL, Angus; AMATO-GAUCI, Andrew. Seroprevalence to influenza A (H1N1) 2009 virus—where are we?. Clin. Vaccine Immunol. 2011.

CASSINI, Alessandro et al. Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. Eurosurveillance, 2018.

CATE, Thomas R. et al. Clinical trials of monovalent influenza A/New Jersey/76 virus vaccines in adults: reactogenicity, antibody response, and antibody persistence. Journal of Infectious Diseases. 1977.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Influenza (Flu): About Flu. 2019a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/index.html>. Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Influenza (Flu): Flu and Heart Disease & Stroke. 2019c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/heartdisease.htm>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Influenza (Flu): Health professionals – ACIP recommendations: Background and Epidemiology. 2019b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/background-epidemiology.htm>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

COUCH, Robert B.; KASEL, Julius A. Immunity to influenza in man. Annual review of microbiology. 1983.

CUREAU, Felipe Vogt et al. Challenges for conducting blood collection and biochemical analysis in a large multicenter school-based study with adolescents: lessons from ERICA in Brazil. Cadernos de saude publica. 2017.

DWYER, Dominic E. et al. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. Medical Journal of Australia. 2006.

ELIZONDO-MONTEMAYOR, Leticia et al. Seroprevalence of antibodies to influenza A/H1N1/2009 among transmission risk groups after the second wave in Mexico, by a virus-free ELISA method. International Journal of Infectious Diseases. 2011.

FRANCIS, Magen Ellen; KING, Morgan Leslie; KELVIN, Alyson Ann. Back to the Future for Influenza Preimmunity—Looking Back at Influenza Virus History to Infer the Outcome of Future Infections. Viruses. 2019.

GAMBLIN, Steven J.; SKEHEL, John J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. Journal of Biological Chemistry. 2010.

GREEN, Helen K. et al. Mortality attributable to influenza in England and Wales prior to, during and after the 2009 pandemic. PLoS One. 2013.

HOSCHLER, Katja et al. Seroprevalence of influenza A (H1N1) pdm09 virus antibody, England, 2010 and 2011. *Emerging infectious diseases*. 2012.

HURT, Aeron C. et al. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *Journal of Clinical Virology*. 2007.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). ICTV Online 2019. ICTV Taxonomy: Taxonomic Information. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em 07 de fevereiro de 2020.

IULIANO, A. Danielle et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. 2018.

IWATSUKI-HORIMOTO, Kiyoko et al. Seroprevalence of pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011.

JANG, Yo Han; SEONG, Baik Lin. Options and obstacles for designing a universal influenza vaccine. *Viruses*. 2014.

KADOGLOU, Nikolaos P. E. et al. Influenza infection and heart failure—vaccination may change heart failure prognosis?. *Heart failure reviews*. 2017.

KATZ, Jacqueline M.; HANCOCK, Kathy; XU, Xiyan. Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation. *Expert review of anti-infective therapy*. 2011.

KIM, Hyunsuh; WEBSTER, Robert G.; WEBBY, Richard J. Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen. *Viral immunology*. 2018.

KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. *Fields virology*. 6 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer: Lippincott Williams & Wilkins. 2016.

KRAMMER, Florian et al. Influenza (Primer). *Nature Reviews: Disease Primers*, 2018.

KWONG, Jeffrey C. et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *New England Journal of Medicine*. 2018.

LIN, Alice V. Indirect Elisa. In: *ELISA*. Humana Press, New York, NY. 2015.

LU, Chun-Yi et al. A highly specific ELISA for diagnosis of 2009 influenza A (H1N1) virus infections. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2012.

MADJID, Mohammad et al. Influenza and atherosclerosis: vaccination for cardiovascular disease prevention. *Expert opinion on biological therapy*. 2005.

MCVERNON, Jodie et al. Seroprevalence of antibody to influenza A (H1N1) pdm09 attributed to vaccination or infection, before and after the second (2010) pandemic wave in Australia. *Influenza and other respiratory viruses*. 2014.

MOROKUTTI, A. et al. Validation of the modified hemagglutination inhibition assay (mHAI), a robust and sensitive serological test for analysis of influenza virus-specific immune response. *Journal of Clinical Virology*. 2013.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Medical microbiology*. 8 ed. Elsevier Health Sciences. 2016.

NGUYEN, Jennifer L. et al. Seasonal influenza infections and cardiovascular disease mortality. *JAMA cardiology*. 2016.

NOVAGEN, I. pET system manual. 1999.

PADILLA-QUIRARTE, Herbey Oswaldo et al. Protective Antibodies Against Influenza Proteins. *Frontiers in immunology*. 2019.

PAULES, Catharine, SUBBARAO, Kanta. *Influenza*. *Lancet*. 2017.

PERETZ, A.; AZRAD, M.; BLUM, A. Influenza virus and atherosclerosis. *QJM: An International Journal of Medicine*, 2019.

PETERANDERL, Christin; HEROLD, Susanne; SCHMOLDT, Carole. Human influenza virus infections. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine*. Thieme Medical Publishers, 2016.

PLESKOV, V. M.; BANNIKOV, A. I.; ZAITSEV, IuV. The receptor-mediated endocytosis of influenza viruses and low-density lipoproteins by tissue cells. *Voprosy virusologii*. 1994.

REDLBERGER-FRITZ, Monika et al. Attributable deaths due to influenza: a comparative study of seasonal and pandemic influenza. *European journal of epidemiology*. 2012.

REED, Carrie; KATZ, Jacqueline M. Serological surveys for 2009 pandemic influenza A H1N1. *Lancet (London, England)*. 2010.

SAM, I.-Ching et al. Seroprevalence of seasonal and pandemic influenza a in Kuala Lumpur, Malaysia in 2008–2010. *Journal of medical virology*. 2013.

SAUERBREI, Andreas et al. Prevalence of antibodies against influenza A and B viruses in children in Germany, 2008 to 2010. *Eurosurveillance*. 2014.

SAUERBREI, Andreas et al. Seroprevalence of influenza A and B in German infants and adolescents. *Medical microbiology and immunology*. 2009.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL (SES-RS). *Boletim epidemiológico da vigilância de influenza - 2013*. Centro estadual de vigilância. Divisão de vigilância epidemiológica. 2014.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL (SES-RS). *Boletim epidemiológico da vigilância de influenza - 2014*. Centro estadual de vigilância. Divisão de vigilância epidemiológica. 2015.

SILVA, Sarah. G. Caracterização fenotípica e funcional da resposta imune de voluntários imunizados contra influenza A (H1N1)pdm09. Dissertação de Mestrado. 2015.

SUBBARAO, Kanta; MURPHY, Brian R.; FAUCI, Anthony S. Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity*. 2006.

UDELL, Jacob A. et al. Association between influenza vaccination and cardiovascular outcomes in high-risk patients: a meta-analysis. *Jama*. 2013.

VASCONCELLOS, Mauricio Teixeira Leite de et al. Sampling design for the Study of Cardiovascular Risks in Adolescents (ERICA). *Cadernos de saude publica*. 2015.

VEMULA, Sai Vikram et al. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses*. 2016.

VON KRIES, Rüdiger et al. Post-pandemic seroprevalence of pandemic influenza A (H1N1) 2009 infection (swine flu) among children 18 years in Germany. *PLoS One*. 2011.

WANG, Taia T.; PALESE, Peter. Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins?. *Nature structural & molecular biology*. 2009.

WARREN-GASH, Charlotte; SMEETH, Liam; HAYWARD, Andrew C. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza - Influenza updates: Influenza update n°360. 2020a. Disponível em: https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/. Acesso em 07 de fevereiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza (Seasonal): Fact sheet on seasonal influenza. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health Organization. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Outbreak Communication - WHO Handbook for Journalists: Influenza Pandemic. Geneva: World Health Organization. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record No 23. 2014. Disponível em: <https://www.who.int/wer/2014/wer8923.pdf?ua=1>. Acesso em 07 de fevereiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO FLUMART OUTPUTS: Influenza Laboratory Surveillance Information by the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS): Global circulation of influenza viruses. 2020b. Disponível em: <http://apps.who.int/flumart/Default?ReportNo=6>. Acesso em 07 de fevereiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record No 32. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326242/WER9432-en-fr.pdf?ua=1>. Acesso em 07 de fevereiro de 2020.

YUAN, Q. et al. Differential diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 infection by detection of haemagglutinin with an enzyme-linked immunoassay. *Clinical microbiology and infection*. 2011.