

## O VÍRUS INFLUENZA E A GRIPE: RELAÇÃO ANIMAL x HOMEM QUAL O FUTURO?

Diversas espécies de animais, inclusive o homem, são susceptíveis ao vírus influenza (VI) tipo A, que é o agente infeccioso causador da gripe. Os sinais clínicos característicos da infecção aguda são febre, tosse, corrimento nasal, anorexia e prostração podendo, nos casos mais graves, evoluir para pneumonia. Os sinais clínicos da doença são semelhantes em humanos, suínos, cães e equinos, porém, com variações na intensidade conforme a espécie animal afetada.

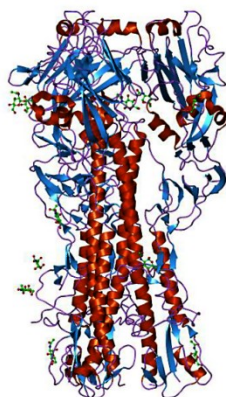
No contexto mundial, a importância epidemiológica da gripe é consequência direta de algumas características estruturais do VI. Mutações são frequentes em seu genoma devido à alta taxa de erros da enzima RNA polimerase ao copiar o RNA viral durante o processo de replicação para a produção de novas partículas virais. Consequentemente, proteínas da estrutura externa do vírus poderão alterar a sua conformação tridimensional, originando novas cepas do vírus antígenicamente diferentes das cepas anteriores, ou parentais. Essas mutações pontuais e graduais são conhecidas como *drift*. Como resultado da ocorrência de *drifts*, uma população tida como imunizada contra determinada cepa do vírus da gripe poderá novamente apresentar a doença, já que a imunização anterior pode ser ineficiente em neutralizar o novo vírus. Com isso, a gripe pode voltar a ocorrer de forma sazonal, epidêmica ou pandêmica.

Em algumas famílias de vírus, como a família *Orthomyxoviridae* à qual pertence o VI, ao invés de DNA o genoma é constituído por RNA. O genoma do VI é composto por oito segmentos de fitas simples de RNA. Cada um desses segmentos, separadamente, carrega gene(s) que codificam proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. Estes genes, depois de traduzidos no interior da célula infectada do hospedeiro, produzem onze proteínas que formam a partícula infecciosa de VI.

### HEMAGLUTININA E NEURAMINIDASE

Existem duas proteínas de grande importância epidemiológica na estrutura externa do VI, a **hemaglutinina** e a **neuraminidase**. A hemaglutinina é uma proteína que se projeta em forma de espícula para o exterior do capsídeo viral (Figura 1). A sua função é adsorver o VI ao receptor (**ácido siálico**) da célula alvo, dando início à infecção. Devido à função primária de ligação do vírus à célula alvo do hospedeiro susceptível, anticorpos produzidos contra a hemaglutinina são capazes de neutralizar o vírus antes que ocorra a infecção. Portanto, a hemaglutinina é o principal antígeno componente das vacinas contra a gripe.

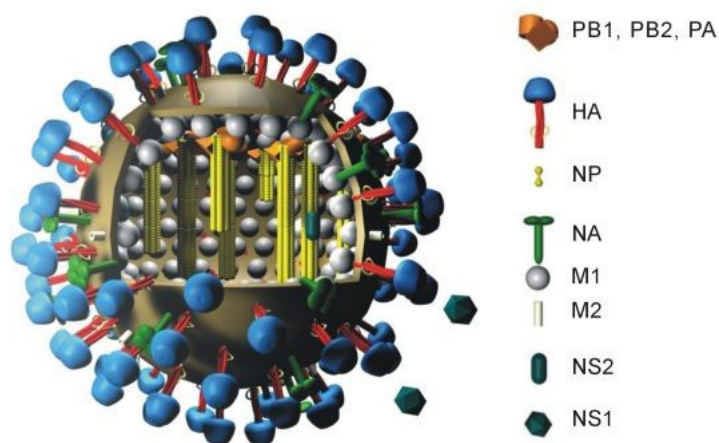
Até o momento foram identificados 16 subtipos de hemaglutinina em VI, denominados **H1** até **H16**. É importante salientar que anticorpos específicos contra um subtipo de hemaglutinina (ex: H1) são ineficientes para neutralizar um subtipo diferente (ex: H3). Além disso, dentro de um mesmo subtipo ocorrem ainda mutações menores (*drifts*) que originam novas cepas virais, entre as quais, poderá ou não existir proteção cruzada eficiente.



**Figura 1.** Estrutura tridimensional da proteína externa hemaglutinina.

<http://www.examiner.com/article/new-h1n1-virus-mutation-found-what-it-means>

A neuraminidase é uma proteína externa do VI, porém, existe em menor quantidade no capsídeo viral quando comparada à hemaglutinina. A neuraminidase é uma enzima (**sialidase**) que facilita a entrada do VI no interior da célula do hospedeiro. Posteriormente, permite que os vírus produzidos no interior da célula sejam liberados para o ambiente extracelular. Desse modo, o VI alcança as células adjacentes e dissemina a infecção pelo organismo. As drogas antivirais normalmente utilizadas no tratamento da gripe em humanos, como o oseltamivir e o zanamivir, atuam competindo com a neuraminidase pelos mesmos sítios onde a enzima do vírus atua, inibindo a sua ação. Desse modo, impede a disseminação do vírus e da infecção retendo a progênie viral no interior da própria célula infectada. Até o momento foram identificados 9 subtipos de neuraminidase no VI, denominados N1 até N9. A combinação entre o subtipo de H e N existente em uma cepa de VI é o método utilizado para nomear as cepas (ex: H1N1, H7N9) (Figura 2).



**Figura 2.** Ilustração do vírus influenza e suas principais proteínas, incluindo a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA).

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flu\\_und\\_legende\\_color\\_c.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flu_und_legende_color_c.jpg)

## REARRANJO GENÔMICO – UMA DAS CAUSAS DA DIVERSIDADE

Existem diversos subtipos de VI em circulação por todo o mundo. No Brasil, por exemplo, os principais subtipos circulando em suínos são o H1N1, H1N2 e H3N2, com alguns casos esporádicos de infecção pelo H3N8.

Teoricamente, é possível que ocorra qualquer combinação entre os 16 subtipos identificados de hemaglutinina (H) e os 9 subtipos de neuraminidase (N). As combinações podem gerar novos subtipos virais (H?N?), além dos já circulantes. A troca de genes entre cepas ou subtipos diferentes é chamada de rearranjo genômico, ou *shift*. O rearranjo ocorre no VI porque o seu genoma é constituído por oito segmentos diferentes de RNA. Se o homem ou animal susceptível for infectado por duas cepas virais distintas, como o H1N1 e o H3N2, no mesmo período, é possível que ocorra uma troca de segmentos de RNA entre as cepas. Desse modo, os vírus produzidos na sequência da infecção podem pertencer a subtipos novos, devido à troca dos segmentos genômicos entre as cepas que iniciaram a infecção. Nesse exemplo hipotético, as cepas **H1N2** ou H3N1 eventualmente surgiriam, por causa do rearranjo genético entre as cepas **H1N1** e H3N2.

## A IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DOS SUÍNOS

Uma das cepas de VI atualmente em circulação na população humana, o pH1N1 (**pandêmico**), logo após o seu surgimento no México em 2009 acabou sendo, injustamente, denominada vírus da gripe “suína”. O pH1N1 causou a mais recente pandemia de gripe na população humana e continua em circulação até hoje. Atualmente, esse vírus é anunciado pela mídia como o vírus da **Gripe A**.

Em termos genéticos, dentre os oito segmentos de RNA genômico do vírus da gripe “suína”, quatro segmentos vieram de VI aviários, apenas três de VI suíno e um de VI de origem humana. Essa diversidade de origens de RNA é consequência de rearranjos genômicos prévios entre cepas diferentes, que ocorreram durante a evolução dessa linhagem viral.

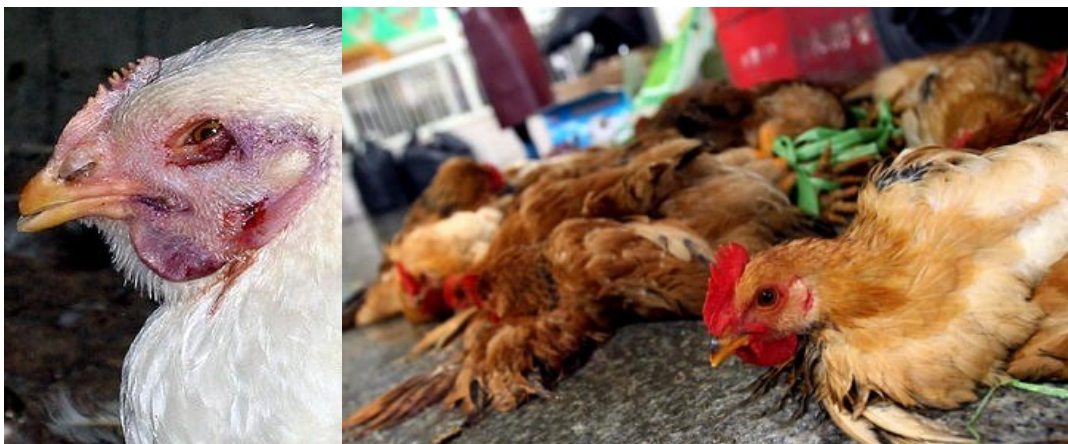
O reservatório natural de todas as combinações possíveis entre subtipos H e N de VI são as aves silvestres, principalmente as aquáticas. Como consequência de mutações frequentes, o VI é capaz de cruzar a barreira interespecie ocasionando a infecção em outras espécies de hospedeiros, principalmente mamíferos. Devido à evolução adaptativa do vírus e o surgimento de linhagens virais distintas, algumas cepas podem adaptar-se a esses novos hospedeiros e, com isso, ocasionarem sinais clínicos e a transmissão do vírus. Essa adaptação, em geral, é mediada pela maior afinidade dessas novas cepas ao receptor viral (**ácido siálico  $\alpha$ -2-6**) que predomina nas células do trato respiratório de **mamíferos**, ao invés do **ácido siálico  $\alpha$ -2-3** que é o receptor viral que predomina nas células respiratórias e intestinais das **aves**. A afinidade do vírus por um tipo específico de receptor celular faz com que o VI tenha maior prevalência na espécie ao qual está mais adaptado. Em equinos, há cerca de trinta anos o único subtipo circulante é o H3N8. A mesma “fidelidade” já não ocorre em suínos e humanos, pois as duas espécies compartilham uma característica em particular. Ambos possuem os receptores  **$\alpha$ -2-3** e  **$\alpha$ -2-6** nas células do trato respiratório, portanto, são susceptíveis tanto a VI originados de mamíferos quanto VI de origem aviária.

Em termos epidemiológicos, o suíno compara-se a um caldeirão para o vírus da gripe, pois funciona como o intermediário que favorece a mistura de cepas virais de origens distintas, aumentando a possibilidade de mutações e rearranjos genômicos entre vírus de diferentes origens, além de sua adaptação ao hospedeiro mamífero. Mesmo

podendo, em algumas situações, apresentar sinais clínicos relativamente brandos, tanto o manejo sanitário quanto a rastreabilidade epidemiológica devem ser intensificados em granjas suínícolas com o objetivo principal de reduzir o risco de que o suíno atue como vetor para o surgimento de novas cepas do VI, como ocorreu no desencadeamento do pH1N1.

### INFLUENZA AVIÁRIA – A PRÓXIMA PANDEMIA?

Diferente da gripe em mamíferos, a gripe aviária não apresenta sinais clínicos restritos apenas ao sistema respiratório. Em aves há maior variedade de sinais clínicos como edemas de face, crista e barbela, cabeça roxa, prostração e diarreia, entre outros. Sinais neurológicos como paralisia, opistótono e convulsão também podem ocorrer. Porém, em alguns casos, pode ser observada apenas a morte súbita das aves (figura 3).



**Figura 3.** Aves apresentando sinais clínicos característicos de influenza

<http://drugline.org/medic/term/influenza-avian/>

<http://www.guardian.co.uk/world/2013/apr/06/bird-flu-threat-shanghai-markets>

Existem dois grandes grupos de VI aviários, que podem ser diferenciados pela gravidade da doença que causam nas aves. O primeiro grupo inclui cepas de **influenza aviária de baixa patogenicidade**, ou **LPAI** (*low pathogenicity avian influenza*). O segundo grupo contém cepas de **influenza aviária de alta patogenicidade**, ou **HPAI** (*high pathogenicity avian influenza*). A infecção de aves com cepas LPAI pode ser subclínica ou apresentar sinais clínicos brandos, a não ser que ocorra a associação com outros agentes infecciosos e/ou condições ambientais desfavoráveis. Já as cepas virais HPAI podem causar até 100% de mortalidade das aves infectadas.

Várias espécies de aves silvestres, principalmente as aquáticas, foram identificadas como reservatório natural das cepas LPAI. As aves infectadas transmitem o vírus por meio de secreções respiratórias e fezes. Surtos de influenza aviária surgem quando cepas LPAI, provenientes de aves silvestres, são transmitidas para aves domésticas e sofrem mutação, tornando-se cepas HPAI. Até o momento, somente os subtipos H5 e H7 foram identificados em cepas virais HPAI.

O H5N1 é uma cepa de VI aviário que surgiu na Ásia, porém surtos da doença já ocorreram na Rússia, no leste europeu e na África. Os surtos causados pelo H5N1 são acompanhados atentamente pelas principais organizações ligadas a saúde humana e animal em todo o mundo (OMS, OIE, FAO, CDC), pois este vírus apresenta potencial para tornar-se o causador da próxima pandemia em seres humanos. Por enquanto, os relatos sustentam que, naturalmente, o H5N1 somente tem o potencial de ser transmitido de forma direta da ave para o ser humano. Conseqüentemente, a grande

maioria dos casos e/ou surtos de H5N1 em seres humanos, descritos até o momento, ocorreu em indivíduos cujo trabalho exigia o contato direto com as aves (Figura 4). Existem casos comprovados de pessoas que foram infectadas por H5N1 transmitido pelo homem, mas são raros e ocorreram em situações de muita proximidade com o doente.



**Figura 4.** Homem dormindo junto às aves antes da levá-las ao mercado.

<http://www.chinapost.com.tw/health/cold-&-flu/2009/01/09/191265/Bird-flu.htm>

A doença causada pelo H5N1 é extremamente grave em seres humanos. Além dos sintomas respiratórios, os indivíduos infectados apresentam diarreia, vômito e dor abdominal, com taxa de mortalidade extremamente elevada, próxima a 60%, entre os doentes.

Qualquer país do mundo está sujeito à ocorrência de um surto de influenza aviária. O reservatório natural dos vírus LPAI são as aves silvestres, e dentre elas, muitas espécies são migratórias e chegam a se deslocar entre continentes (Figura 5)



**Figura 5:** aves aquáticas migratórias.

Embora a doença causada pelo H5N1 seja extremamente grave no ser humano, o vírus não é transmitido para o homem com a mesma facilidade de uma gripe sazonal de inverno. É difícil contrair a doença, pois o H5N1 não está adaptado ao ser humano. A maioria das cepas de VI em aves silvestres é de baixa patogenicidade e não pode ser transmitida a grande distância ou disseminada pelo ar. Conforme comentado anteriormente, as pessoas infectadas pelo H5N1 tiveram contato direto com aves. Contudo, os estudos preliminares demonstram que a adoção de cuidados básicos de higiene e profilaxia reduz drasticamente o risco de transmissão desse vírus da ave para o homem não havendo, com isso, motivo para preocupação excessiva, principalmente nas condições de criações brasileiras.

### **O NOVO SUBTIPO - H7N9**

Em março de 2013 surgiu, na China, um novo subtipo de VI tipo A aviário, o H7N9. Essa nova cepa de VI também tem ocasionado doença respiratória gravíssima, seguida de pneumonia com alta taxa (32,6%) de letalidade em seres humanos 44 óbitos em 135 infectados – Fonte: WHO, 13.08.2013). Em 07.08.13 foi anunciado o primeiro caso comprovado de transmissão do H7N9 entre seres humanos. Assim como nos casos relatados de transmissão do H5N1 entre seres humanos, também nesse caso havia o contato muito próximo entre as vítimas pois ocorreu em uma mulher que tratava de seu pai infectado com o H7N9. Contudo, também foram relatados casos de sintomas brandos de gripe associados ao H7N9 e até o momento, a ocorrência de surtos da doença está restrita somente à China.

O subtipo H7N9 nunca havia sido detectado anteriormente em qualquer espécie animal ou no homem. Suspeita-se que o vírus já circulava entre as aves, mas como não causava doença acabou passando despercebido e nunca foi identificado.

De forma semelhante ao H5N1, o H7N9 também é transmitido diretamente da ave para o homem e o ser humano não é infectado com facilidade. Contudo, devido às mutações que frequentemente ocorrem no VI, a probabilidade de que esse novo subtipo possa ser o agente etiológico de uma pandemia no futuro não pode ser descartada.

### **A PRÓXIMA PANDEMIA, POR “UM FIO”**

Recentemente, uma equipe de pesquisadores do Erasmus Medical Centre, Holanda, identificou quais mutações seriam necessárias para que o já mortal H5N1 transforme-se em um vírus pandêmico. Para que uma cepa de VI possa ser o agente etiológico de uma pandemia é necessário que o vírus seja passível de transmissão pelo ar e, com isso, possa ser disseminado na população sem a exigência de grande proximidade entre as pessoas ou de aglomerações (Figura 6).



**Figura 6:** utilização de máscaras para evitar a contaminação / disseminação de doenças transmissíveis pelo ar.

De acordo com os mesmos pesquisadores, duas novas características são necessárias ao H5N1 para torná-lo pandêmico. Primeiro, a hemaglutinina deve passar a ter afinidade pelo receptor celular de mamíferos, o ácido siálico  $\alpha$ -2-6. Segundo, deve haver uma modificação na enzima RNA polimerase do vírus, capacitando-o a se multiplicar com eficiência em células de mamíferos. Finalmente, os pesquisadores concluíram que, com apenas mais cinco mutações, o vírus seria capaz de adquirir essas características e tornar-se transmissível pelo ar.

Com isso, fica uma questão em aberto. Será possível que as mutações identificadas por esses pesquisadores venham a ocorrer na natureza, de modo que o H5N1 circulante se torne uma cepa viral pandêmica? Infelizmente, a resposta é **SIM**. De acordo com um estudo conduzido na Universidade de Cambridge, várias dessas mutações **já ocorreram** em cepas aviárias de VI que circulam atualmente nas aves. Além disso, em certas cepas sequenciadas que já possuíam a maioria das mutações necessárias, a mudança de somente mais três a quatro nucleotídeos no genoma viral (ex: ATGC) já tornaria o H5N1 pandêmico.

Conforme estimativas e modelos matemáticos que tiveram como base o cenário de 1918, época em que ocorreu a principal pandemia de gripe da história da humanidade, caso o H5N1 seja o agente da próxima pandemia, mais de cem milhões de pessoas em todo o mundo morrerão como consequência da gripe aviária pandêmica.

## **A INFLUENZA ANIMAL NO BRASIL**

### **Equinos**

No Brasil o vírus da influenza equina é endêmico. Em 2012, provavelmente devido ao surgimento de uma nova cepa viral, uma epidemia de influenza equina varreu

toda a América do Sul, incluindo o Brasil. No período de dois meses, o vírus foi capaz de percorrer o país de norte a sul, causando doença em cavalos de todas as raças e idades, vacinados ou não.

Existem vacinas contra a influenza equina disponíveis no Brasil. Normalmente, os laboratórios fabricantes adicionam dois subtipos de VI equino na formulação do imunógeno, o H7N7 e o H3N8. Porém, o subtipo H7N7 não é isolado de equinos doentes há mais de trinta anos, sendo atualmente considerado extinto pela OIE.

Devido às constantes mutações do VI, a OIE faz uma vigilância epidemiológica “mundial” através de amostras enviadas para laboratórios de referência existentes nos EUA e Europa, com o objetivo de identificar quais as cepas relevantes em circulação pelo mundo. Infelizmente, poucas amostras provenientes de países sul americanos são enviadas a esses laboratórios para diagnóstico. Como resultado desse trabalho de vigilância, anualmente a OIE divulga um comunicado sugerindo quais cepas de VI devem estar presentes nas vacinas equinas, para que a imunização seja eficiente contra os vírus atualmente em circulação, diminuindo o risco de falhas vacinais. Na prática, poucos fabricantes de vacina seguem essas recomendações.

Segundo a legislação brasileira, a influenza equina é uma doença de notificação obrigatória.

### **Suínos**

No rebanho suíno brasileiro a prevalência do vírus da influenza é alta e, até o momento, não existem vacinas comerciais contra a gripe suína no mercado nacional.

Apesar de o suíno constituir-se em peça importante do quebra-cabeça da epidemiologia do vírus da gripe humana, não existe uma política oficial de vigilância das cepas circulantes no país. Os trabalhos de pesquisas e de investigação da prevalência de influenza suína realizados no país têm sido conduzidos na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia, SC e em algumas universidades públicas.

### **Aves**

A influenza aviária é considerada uma doença exótica no Brasil. Os Ministérios da Saúde e da Agricultura fazem a vigilância epidemiológica por meio de sorologia e detecção do vírus, concentrando as ações em regiões com aves silvestres migratórias.

A utilização da vacina contra influenza aviária é proibida no Brasil, a não ser em caso de surto.

### **Cães**

Embora os cães sejam animais de estimação, a ocorrência da gripe nesta espécie animal chama a atenção pela proximidade que os cães têm com o ser humano. A gripe canina é causada por duas cepas do vírus de influenza que, recentemente, se adaptaram e são transmitidas entre cães. A primeira é o H3N8, de origem equina, com alta prevalência nos EUA. A segunda é o subtipo H3N2, de origem aviária, que inicialmente surgiu na Coreia e atualmente tem sido detectado na China.

Não se sabe ao certo qual a situação desse vírus no Brasil. Existem evidências sorológicas de infecção de cães por diversos subtipos de influenza, mas a sorologia apenas indica um contato anterior com o VI, proveniente de qualquer espécie animal ou até mesmo do ser humano. A sorologia não possibilita a comprovação da transmissão do VI entre cães com sinais clínicos ocasionados pelo VI canino.

No Laboratório de Virologia Animal da UEL identificamos três casos distintos de vírus de influenza A em pulmões de cães provenientes da macrorregião de Londrina.



Atualmente, estamos trabalhando com essas cepas virais com o objetivo de determinar os subtipos H e N.

### **Considerações finais**

Não há dúvidas de que, em virtude de sua complexidade molecular, antigênica e epidemiológica, o vírus influenza é um dos principais patógenos que compromete tanto a saúde humana quanto a saúde animal.

Em Medicina Veterinária, além dos aspectos relacionados à saúde e produção, o monitoramento constante das cepas de VI circulantes, tanto em animais de produção quanto de estimação e silvestres, apresenta importância em saúde pública. As grandes epidemias e pandemias de influenza, registradas em seres humanos, tiveram como origem cepas aviárias que passaram por um período de adaptação em um mamífero, principalmente o suíno, onde o vírus desenvolveu as características moleculares e antigênicas, comentadas anteriormente, necessárias para a replicação e disseminação entre os humanos.

No Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, desenvolvemos projetos de pesquisa com o vírus influenza nas espécies equina, suína e canina. A proposta inclui o isolamento viral em células de linhagem contínua e em ovo embrionado de galinha; caracterização dos isolados por técnicas virológicas clássicas como hemaglutinação e inibição da hemaglutinação; estudos moleculares para diagnóstico e tipificação dos isolados virais por RT-PCR e sequenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados. Além do diagnóstico virológico, o principal objetivo desses estudos é a caracterização dos subtipos virais predominantes nas cepas circulantes em animais, contribuindo com a vigilância epidemiológica dessa virose que é de grande importância, tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública.

Com isso, estudos relativos à virologia clássica, como o isolamento de cepas virais de animais (aves e mamíferos) e a definição de suas características hemaglutinantes; bem como estudos moleculares como a definição de tipos e subtipos genômicos, caracterização de mutações pontuais, rearranjos genômicos, sequenciamento de nucleotídeos de genes importantes e até mesmo do genoma completo, para a definição das características antigênicas das cepas circulantes, devem ser realizados de forma rotineira e constante. Os resultados desses trabalhos são importantes na condução de estudos epidemiológicos, relacionados à análise de riscos da infecção em determinada espécie animal, região ou país, assim como para a elaboração de planos de contingenciamento da infecção, que contemplem medidas específicas de mitigação de risco, de acordo com o tipo viral circulante.

O desenvolvimento de todas essas ações complexas, com características multi, trans e interdisciplinares, demonstra a importância do profissional médico veterinário no contexto da saúde animal e da saúde pública.

Por fim, respondendo à pergunta título dessa matéria: **Qual o futuro?**

Infelizmente, o futuro é **incerto**.

Estamos à mercê da genética e de poucas bases de nucleotídeos.

Nessa situação, o que podemos fazer?

**Vigilância, vigilância e, sobretudo... vigilância (epidemiológica).**

**Edsel A. Beuttemüller**, Médico Veterinário (CRMV/PR 7318), doutorando em Ciência Animal (Área de Concentração Sanidade Animal), Universidade Estadual de Londrina.

**Profa. Dra. Alice F. Alfieri<sup>1</sup>** (CRMV/PR 3047)

**Prof. Dr. Amauri A. Alfieri<sup>1</sup>** (CRMV/PR 1.377)

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

**Fontes Consultadas:**

<http://www.who.int/en/>

<http://www.oie.int/>

<http://www.cdc.gov/>

<http://www.fao.org/home/en/>