



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Microbiologia

O paradigma da vacina da Influenza

Revisão narrativa das vacinas atuais e perspetivas futuras na vacinologia da doença pelo vírus *Influenza*

Joana Catarina Ferreira da Silva

Orientado por:

Professor Doutor Thomas Hänscheid

Julho'2021

Resumo

A doença provocada pelo vírus *Influenza* é etiologia mundial de doença respiratória aguda que cursa com hospitalizações e mortes anualmente. Neste sentido, antivirais foram criados para melhorar o prognóstico dos doentes com patologia severa, no entanto, têm demonstrado reduzir os dias de doença em apenas 1 dia. Assim, a vacina é a único método que efetivamente reduz a morbimortalidade da doença, traduzindo-se numa diminuição do número de hospitalizações e mortes.

O vírus *Influenza* tem duas glicoproteínas - Hemaglutinina (HA) e Neuramidase (NA) – cuja porção superior dos antígenos HA/NA mutam-se constantemente, reduzindo o reconhecimento imunitário e a neutralização viral. Historicamente, os vírus *Influenza* demonstraram capacidade para sofrer alterações significativas, mecanismo denominado de *antigenic-shift*, tendo cursado com pandemias e vulnerabilizado a população mundial. A sazonalidade do vírus *Influenza* deve-se a mutações *minor* constantes das glicoproteínas, mecanismo denominado de *antigenic-drift*, permitindo a recorrência de infeção pela Influenza. De modo que, a produção de vacinas atuais tem eficácia oscilante, é dependente da qualidade e quantidade de ovos disponíveis, é um método de produção moroso com fatores externos capazes de induzir mutação. Neste sentido, novas vacinas foram idealizadas por formar a contornar as fragilidades das vacinas atuais. Porventura, apenas recentemente, pela necessidade de produção de vacinas face à pressão que a pandemia pela COVID-19 exerceu, novos métodos de produção de vacinas têm surgido e demonstrado abrir portas a alternativas custo-eficazes para a vacinologia de várias doenças infecciosas.

O objetivo desta Tese é fazer uma revisão narrativa sobre as fragilidades das vacinas atuais e avanços na vacina da Influenza. A metodologia baseia-se na pesquisa bibliográfica na PubMed, Centre for Disease control and Prevention (CDC), European Centre for disease prevention and Control (ECDC).

Palavras-chave: mutações do vírus *Influenza*, vacina da Influenza, vulnerabilidades da vacina, novas vacinas

"O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados"

Abstract

The Influenza virus is a worldwide aetiology of an acute respiratory disease that progresses with hospitalizations and deaths annually. In this sense, antivirals mean to improve the prognosis of patients with severe pathology. However, they have shown to reduce the days of illness in just one day. Thus, the vaccine is the only method that effectively reduces the morbidity and mortality of the disease, resulting in a decrease in the number of hospitalizations and deaths.

The Influenza virus has two glycoproteins - Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA) - whose upper portion of the HA/NA antigens constantly mutate, reducing immune recognition and viral neutralization. Historically, Influenza viruses have shown the ability to undergo significant changes, a mechanism called antigenic-shift, leading to pandemics and making the world population vulnerable to develop Influenza disease. The seasonality of the Influenza virus is due to constant minor mutations in the glycoproteins, a mechanism known as antigenic drift, allowing the recurrence of Influenza infection. So, the efficacy of the current vaccine of current vaccines are fluctuating, depends on the quality and quantity of eggs available, is a time-consuming production method with external factors capable of inducing mutation. In this sense, new vaccines emerged to overcome the weaknesses of current vaccines. Perhaps, only recently, due to the need to produce vaccines given the pressure by the COVID-19 pandemic, new vaccine production methods have emerged and have been shown to open the door to cost-effective alternatives for the vaccinology of various infectious diseases.

This thesis aims to do a narrative review about the weaknesses of current vaccines and advances in the Influenza vaccine. The methodology based on a literature search in PubMed, Center for Disease Control and Prevention (CDC), European Center for Disease Prevention and Control (ECDC).

Keywords: Influenza virus mutation, Influenza vaccine, vaccine weaknesses, new vaccines

"O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados"

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iv
Índice de Figuras	v
Índice de Quadros	v
Lista de Abreviaturas	vi
I. Introdução	1
II. Metodologia	4
III. Perspetiva Histórica do vírus <i>Influenza</i>	5
IV. Virologia da Influenza	9
IV.1. Classificação e Morfologia viral	9
IV.2. Tropismo e Mecanismo de replicação dos vírus <i>Influenza</i> A e B	12
IV.3. Resposta imunológica	14
IV.4. Mutações virais	18
IV.5. Evasão Imunitária	21
IV.6. Epidemiologia	24
IV.7. Apresentação Clínica	29
IV.8. Diagnóstico	32
IV.9. Tratamento	36
V. Vacinologia	38
V.1. Aplicabilidade do plano de vacinação atual	40
V.2. Vacinas da Influenza disponíveis na Europa	42
V.3. Imunogenicidade das atuais vacinas da Influenza	50
V.4. Fragilidades das vacinas atuais da Influenza	51
V.5. Propostas de novas vacinas da Influenza	52
VI A influência da pandemia da COVID-19 no futuro da vacinologia	59
VII. Conclusões e Perspetivas Futuras	63
VIII. Bibliografia	65

Agradecimentos

Neste cessar de percurso académico na Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e do Trabalho Final de Mestrado regozija-me agradecer a orientação e ensinamentos que várias pessoas atenciosamente me deram.

Começo por agradecer ao Professor Doutor Thomas Hänscheid pela oportunidade de ter-me dado liberdade na escolha do tema da Tese, aceite e orientado o Trabalho Final de Mestrado. Não podendo deixar despercebida a oportunidade de me ter acolhido juntamente com a Catarina Duarte no projeto GAPIC, ter ensinado a aplicar o conceito de *Occam's Razor* tanto na Ciência como a sua integração na prática clínica. Agradeço também a oportunidade e a confiança que o Professor Thomas Hänscheid atribui a mim e à Sara Mahomed ao convidar-nos a participar no projeto de tradução para português da versão inglesa da revista *Covid Reference* da autoria Dr. Bernard Kamps. Thank you so much Professor.

À minha amiga Catarina Sá, aos meus amigos do curso e às minhas colegas de casa (Elisa e Bia) por me terem acompanhado durante o Trabalho Final como no meu percurso académico.

Por último, e não menos importante, à minha família pelas oportunidades que me têm proporcionado como a minha formação em Medicina. Um especial agradecimento ao meu irmão Vítor pelo apoio emocional.

“No more things should be presumed to exist than the necessary, i.e., the fewer assumptions an explanation of a phenomenon depends on, the better the explanation.”

William of Occam, 1285-1347

Índice de Figuras

Figura 1: Cronologia da circulação do vírus Influenza A

Figura 2: Representação visual do vírus *Influenza A*

Figura 3: Ativação e ação das células dendríticas (CDs)

Figura 4: Mecanismo de ação dos anticorpos à infeção pelo vírus Influenza

Figura 5: Taxa de mutação em diferentes patogénicos *per site per generation*

Figura 6: Taxa de mutação dos agentes patogénicos por unidade *per site per year*

Figura 7: Percentagens anuais entre 2012 – 2021 das variantes do vírus Influenza circulante

Figura 8: Percentagens das etiologias de infeção respiratória no Inverno na época de 2018-2019 em Portugal

Figura 9: Processo de produção da vacina segundo o modelo dos ensaios clínicos

Índice de Quadros

Quadro 1: Representação esquemática da origem, número total de casos, número de mortes e lições aprendidas em cada uma das epidemias e pandemias do século XX e XXI

Quadro 2: Representação esquemática dos grupos considerados de risco para complicações da Influenza em Portugal, Europa e nos EUA

Quadro 3: Esquematização da proporção dos sintomas de 3744 participantes num estudo observacional feito no outono e inverno de 1994 – 1998

Quadro 4: Representação dos testes de diagnóstico da Influenza

Quadro 5: Representação esquemática dos grupos de vacinação da Influenza em Portugal, Europa e nos EUA

Quadro 6: Novas vacinas disponíveis da Influenza – representação do mecanismo da vacina, valências comparativamente às vacinas atuais e as suas fragilidades.

Lista de Abreviaturas

AEC - Antes da Era Comum	IgG - Imunoglobulina G
AFCs - Células B produtoras de anticorpos	IgM - Imunoglobulina M
ARDS - Acute Respiratory Disease Syndrome	IL-10 - Interleucina-10
CDC - Centers for Disease Prevention and Control	ITS - Standardized intensity thresholds
CDs - Células dendríticas	MEM - Moving Epidemics Method
CM2 - Proteína de envelope	MCDK - Madin-Darby Canine Kidney
CTLs - Células citotóxicas	mRNA - RNA mensageiro
DALYs - Anos de vida ajustados por incapacidade	NA ou N – Neuraminidase
DFA - Imunofluorescência direta aos anticorpos	NEP - Proteínas exportadoras
DGS - Direção Geral de Saúde	NK - Células <i>natural killer</i>
DNA - Ácido desoxirribonucleico	NP - Nucleoproteína
ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control	NS2 - Proteína não-estrutural 2
EIAs - Imunotestes enzimáticos	OAS - Original Antigenic Sin
EC - Era comum	PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns
FC células - Células trigger efetoras	PCR - Proteína C Reativa
FDA - US Food and Drug Administration	PIB - Produto interno bruto
HA ou H - Hemaglutinina	PRRs - Pattern recognition receptors
HA/NA - Hemaglutinina/Neuraminidase	RNA - Ácido ribonucleico
HAI - Testes de inibição da Hemaglutinação	RNP - Ribonucleoproteína
HEF - Hemaglutinina-esterase-fusão	RT-PCR - Técnica de reação de transcrição de polimerase reversa
IFN- γ - Interferão- γ	S - Spike
IFN I - Interferão I	TCR - Recetor das células T
IFN III - Interferão III	Tregs - Células T reguladoras
IgA - Imunoglobulina A	VIH - Vírus de Imunodeficiência
	vRNA - RNA viral

I. Introdução

A Influenza é a designação da doença respiratória causada pelo vírus *Influenza* pertencente à família *Orthomyxoviridae*. O vírus *Influenza* A H1N1 e H3N2 como o vírus *Influenza* B são os protagonistas das epidemias sazonais anuais que afeta anualmente cerca de 35.5 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo determinante de anos ajustados por incapacidade (DALYs) na Europa juntamente com a Tuberculose e a Doença pneumocócica invasiva (Krammer et al., 2018) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a).

O vírus *Influenza* é conhecido pelos seus picos epidémicos sazonais como pela história pregressa de pandemias, sendo que a pandemia mais conhecida é de 1918 que avassalou a humanidade (Centers for Disease Control and Prevention, 2019c). A etiologia subjacente da sazonalidade da Influenza deve-se à constante labilidade mutacional da porção superior das glicoproteínas Hemaglutinina e Neuraminidase que, por sua vez, são os principais responsáveis pela indução da resposta do sistema imunitário do indivíduo (Steinhauer, 1999) (Hale, Albrecht, & García-Sastre, 2010). Consequentemente, o vírus *Influenza* reduz a sua taxa de eliminação ao contornar os mecanismos imunológicos, otimizando a sua replicação viral e o aparecimento de quadro clínico como o início súbito de febre, cefaleias, mialgias ou, em casos severos, de pneumonia viral e subsequente hospitalização do indivíduo (Montalto, 2003).

As diretivas americanas, europeias e portuguesas aconselham a administração de antivirais, como os inibidores de neuraminidase (Oseltamivir ou Zanamivir) e o Baloxavir Marboxil, cujo intuito é melhorar o prognóstico do doente com doença severa (Direção-Geral da Saúde, 2015) (European Centre for Disease Prevention and Control, n.d.-a) (Centers for Disease Control and Prevention, 2021c). No entanto, o Oseltamivir e o Baloxavir Marboxil mostraram diminuir em apenas 0.5 dias e 0.75 dias de doença, respetivamente (Gupta, Meenu, & Mohan, 2015). Por conseguinte, a prevenção da Influenza é a forma que tem demonstrado mudar o curso da morbidade e da mortalidade da doença, como é o caso de um plano adequado de vacinação mundial (WHO, n.d.-b).

As vacinas da Influenza atuais são administradas anualmente aos grupos de risco de desenvolver severidade de doença, como grávidas, idosos com mais de 65 anos, crianças entre 6 meses a 53 meses, indivíduos com doenças crónicas como cardiovascular,

respiratória, renal, hematológico como doentes com afeção do sistema imunitário conferindo proteção imunológica (Centers for Disease Control and Prevention, 2021h). Atualmente, a produção da vacina tem como alvo a porção superior das glicoproteínas HA/NA do vírus *Influenza* por serem os principais indutores de resposta imune (Sanjuán, Nebot, Chirico, Mansky, & Belshaw, 2010) (Domingo, 1997). No entanto, são porções que constituem sob constante mutação e, conseqüentemente, a imunidade das vacinas é efêmera cuja duração média é de 4 meses cuja efetividade varia anualmente entre 20% e os 60% cuja mediana é cerca de 43% (Centers for Disease Control and Prevention, 2020a)(Skowronski, Tweed, & De Serres, 2008). Por forma a otimizar a eficácia e/ou efetividade da vacina, anualmente, as entidades reguladoras preveem as estirpes prováveis de circular na época seguinte e ajustam a produção das vacinas de acordo com prováveis combinações HA/NA. No entanto, o processo de produção das vacinas atuais têm as suas fragilidades como a morosidade na produção que propicia pressão mutacional aos vírus *Influenza*, ser limitador face à integração das novas variantes que possam surgir como são também dependentes de milhões de ovos todos os anos que necessitam de condições ideais (Khurana et al., 2019)(Wong & Webby, 2013).

Numa tentativa de ultrapassar estas fragilidades, surgiram novos protótipos de vacinas que se focam em diferentes alvos de ação, tais como alvo na porção *stem* das glicoproteínas e outras glicoproteínas, como alternativas do mecanismo de produção, (vacinas mRNA ou DNA e vetores). No entanto, são métodos dispendiosas e carecem de dados face à sua eficácia, efetividade e efeitos da vacina pelo baixo investimento das mesmas (Wong & Webby, 2013).

Porventura, em 2019, surgiu uma nova variante do coronavírus, o SARS-CoV-2, tendo sido declarado pandemia em Março de 2020. A COVID-19, designação da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, tem instigado quadro clínico severo em doentes de diversas faixas etárias. Pela ausência de tratamento eficaz da doença, a vacina da COVID-19 é a alternativa que permitirá a redução de casos severos pela doença. Conseqüentemente, novas formas de produção rápidas e com eficácia considerável têm surgido. Assim, novas vacinas, previamente existentes formatos protótipo, têm sido desenvolvidos, como a vacina mRNA e vetor. Conseqüentemente, permitirá explorar novas formas de produção de vacina e abrir portas para a mudança do paradigma para outras doenças infecciosas.

O foco do Trabalho Final de Mestrado é, para além da contextualização do vírus *Influenza* e do decurso clínico, abordar quais são as vacinas atualmente disponíveis no mercado, quais são os seus benefícios, vulnerabilidades, como novas vacinas que podem otimizar a imunogenicidade ao ultrapassar as vulnerabilidades atuais do método de vacinação atual e, por último, contextualizar a importância da pandemia da COVID-19 na reinvenção da abordagem de produção de vacinas em doenças infecciosas como o caso da Influenza.

II. Metodologia

A metodologia do Trabalho Final de Mestrado focou-se na pesquisa bibliográfica no motor de busca do website PubMed, Centers for Disease control and Prevention (CDC), European Centre for disease prevention and Control (ECDC), US Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) e Direção Geral de Saúde (DGS). As expressões usadas na pesquisa estão demonstradas na tabela seguinte.

Capítulos	Expressões usadas no motor de busca
Introdução	Pubmed: “Influenza vírus”, “Influenza epidemiology”, “Influenza mutation” AND “antigenic-drift”, “Influenza vaccine” CDC: “Influenza epidemiology”, “Influenza vaccine”AND“outcomes”, “Influenza mismatch”
Perspetiva Histórica	Pubmed and CDC: “Influenza Pandemic 1889”, Influenza pandemic 1918”, “Influenza pandemic 1957”, “Influenza pandemic 1968”, “Influenza pandemic 1977”, “Influenza pandemic 2004”, “Influenza pandemic 2009”, “Diagnosis Influenza pandemic 2009” CDC: “timeline Influenza virus”
Virologia	Pubmed: “Influenza morphology”, “Influenza pathophysiology”, “Influenza immunology”, “Immune system in the elderly” e “Influenza” Pubmed, CDC e ECDC: “Influenza epidemiology 2017-2018” DGS: “Epidemiologia Influenza 2017-2018 em Portugal” Pubmed: “Influenza clinical presentation” Pubmed e CDC: “Influenza diagnosis”, “Influenza 2009 diagnosis” Pubmed e CDC: “Influenza treatment”
Vacinologia e Novas vacinas	Pubmed , CDC e ECDC “ Vaccines” , “FDA approved vaccines” , “live attenuated vaccine” , “baculovirus Influenza vaccine” Pubmed, CDC: “Reverse Influenza vaccine”, “Virus-like vaccine”, “Vector vaccines”, “RNA and DNA Influenza vaccine”, “M2e Influenza vaccine”, “CTL Influenza vaccine” “Universal vaccine”
A influência da pandemia da COVID-19 no futuro da vacinologia	CDC “COVID-19 Timeline”, “SARS-CoV-2 vaccines”, “mRNA vaccines Adenovirus” PubMed “mRNA Influenza vaccine”, “DNA Influenza vaccine”, “vector Influenza vaccine”, “M2e Influenza vaccine”, “CTLs Influenza vaccine”, “Universal Influenza vaccine”

III. Perspetiva Histórica do vírus *Influenza*

Especula-se que os primeiros casos de infeção pela Influenza foram reportados por Hipócrates pela designação de “*febris catarrhalis epidemia*” no século XVIII (Grant, 1782). No entanto, entre 450 e 430 AEC, o Médico e Filósofo Hipócrates no volume denominado “Epidemias” do livro “*Corpus Hippocraticum*” relata um episódio designado “*βήχας του περινθήκου*” – “A Tosse de Perinthus” que descreve uma infeção do trato respiratório superior cuja é considerada como a possível primeira descrição de pandemia da Influenza na História da Humanidade (Baillière, 1840).

A designação de “epidemia” sofreu alterações semânticas mesmo antes do tempo de Hipócrates. Inicialmente, o termo “*epidemios*” referia-se à movimentação de pessoas. Em 450 AEC, Hipócrates definia “epidemia” como um conjunto de sinais e sintomas nos doentes numa determinada localização espacial e temporal, como exemplo a tosse de Inverno da ilha Kos. A partir da Idade Média, o termo “epidemia” foi usado pelos cidadãos na designação das sucessivas ondas pestilentas ocorridas neste período. Louis Pasteur e Robert Koch, no século XIX, assumiram na definição de “epidemia” à sua associação a um microrganismo. Por último, o termo “epidemia” foi usado na designação de conjuntos de clones de bactérias ou vírus que, mais tarde, se correlacionou à propagação do agente na transmissão pessoa-a-pessoa (Baillière, 1840). A origem grega de pandemia provém de *pan* (todos) + *demos* (pessoas) = *pandemos* (a todas as pessoas/público/comum). Na década de 1660 ocorreu a Grande peste bubónica ou morte negra que marcou a população mundial e a palavra epidemia teve uma extensão insuficiente para o incidente (Johnson, n.d.). Mais tarde, em 1853, a designação de pandemia surgiu para a definição do grande surto de cólera que avassalou a população mundial (Online Etymology Dictionary, n.d.-b).

Após a epidemia ocorrida durante a invasão da Guerra na Prússia em 1745, a Europa utilizou a designação “La Grippe” para a expressão de quadro de tosse e dificuldade respiratória. À posteriori, durante o mandato presidencial de John Tyler, a epidemia da Influenza foi pela primeira vez associada ao termo “La Grippe”, cuja terminologia ainda é utilizada nos tempos modernos (History, 2020a) (Online Etymology Dictionary, n.d.-a). Durante a época de 1889 –1890, os jornais polacos reportaram o desenvolvimento da pandemia Russa associada à guerra do Império Russo, tendo o primeiro caso da Influenza sido reportado pelo médico britânico H. F. Parsons. Posteriormente, Koch e

Pasteur providenciaram o conhecimento, após anos de dedicação às pandemias prévias de cólera, da associação de agente patogénico etiológico a doença, da virulência e a associação da atenuação de severidade de doença pela existência de imunidade adquirida (Kempińska & Woźniak, 2013)(Mendelsohn, 2002). Durante 1918-1920 ocorreu a maior pandemia do século XX cuja designação de Gripe Espanhola deve-se pela primeira notificação de casos ter sido declarada em Espanha uma vez que a imprensa espanhola não foi censurada durante a Primeira Guerra Mundial. No entanto, os primeiros casos remontam aos Estados Unidos da América (EUA), no estado de Kansas (History, 2020b). A morte azul foi uma definição alternativa para a pandemia de 1918 pela correlação aos episódios de cianose e hemorragias intensas nos doentes com quadro de Influenza severa. Cientistas associaram a etiologia principal de severidade e morte dos doentes durante a gripe espanhola à pneumonia secundária bacteriana. No entanto, mais de 70% dos casos severos e morte reportados na época correlacionaram-se à etiologia de infeção primária pelo vírus *Influenza* (Lemon & Mahmoud, 2005).

Em 1930 isolou-se o vírus *Influenza* pela primeira vez o que permitiu em 1940 a produção da primeira vacina da Influenza em meio de ovos. Subsequentemente, os médicos consideraram a administração da vacina viva atenuada obrigatória aos militares do exército e, em 1945, a vacina é aprovada para administração na população geral. Em 1960 a vacina é considerada obrigatória para doentes com doenças crónicas, idosos com mais de 65 anos e grávidas visto que apresentavam maior vulnerabilidade para quadro de Influenza severo. (Centers for Disease Control and Prevention, 2019c).

Em 1957-1958 Hong Kong declarou os primeiros casos da estirpe H2N2. Posteriormente, em 1968-1969, a estirpe H3N2 surge pela mutação da glicoproteína Hemaglutinina da pandemia de Hong Kong (H2N2), tendo a pandemia de H2N2 conferido imunidade aos doentes nesta pandemia (Eickhoff & Meiklejohn, 1969). Em 1977 a estirpe H1N1 ressurgiu tendo provocado doença até dez vezes mais severa nos jovens com menos de 22 anos que não tinham sido previamente expostos ao vírus na epidemia de 1947-1956 (Rozo & Gronvall, 2015).

Durante o século XX e XXI ocorreram epidemias e pandemias cíclicas pelo vírus *Influenza* que conferiram proteção para quadro severo de Influenza nos indivíduos que foram infetados pela combinação de Hemaglutinina/neuraminidase (HA/NA) idênticas. Um estudo observacional feito em 1982 comparou a concentração de anticorpos medido

pelo teste de imunodifusão radial direta em pessoas com menos de 22 anos e mais de 22 anos que já tinham sido expostos previamente a uma epidemia de HA/NA idênticos de Influenza confirmado laboratorialmente. Constataram que o grupo com mais de 22 anos teve apresentação clínica menos severa, no entanto, produziam a mesma concentração de anticorpos face à infecção aguda pela Influenza mas em menor tempo comparativamente ao grupo com menos de 22 anos (Angelova, 1982).

O aparecimento de novas mutações HA/NA ocorre pelo ajuste viral face à pressão exercida pelos fatores externos virais, tais como o sistema imunitário do indivíduo (Krammer, 2019). O *antigenic-drift* é o mecanismo que denomina pequenas alterações nas glicoproteínas HA/NA produzindo uma variante viral com estrutura idêntica ao original (Krammer, 2019). As pandemias tendem a surgir quando ocorre o *antigenic-shift*, mecanismo que denomina alterações abruptas e significativas dos segmentos HA/NA que permitem o aparecimento de uma nova variante do vírus *Influenza*, vulnerabilizando o indivíduo à manifestação clínica de Influenza por esta não ter sido exposta previamente a essas mutações (Krammer, 2019).

Os ventiladores foram criados em 1928 pelos Professores de Saúde Pública em Massachussets Philip Drinker e Louis Agassiz Shaw como técnica de suporte na ressuscitação humana. Mais tarde, na década de 1940, foram usados no suporte sintomático de casos graves da Influenza. Porventura, os ventiladores são comumente reconhecidos pelo seu recurso massivo durante a pandemia de poliomielite de 1952, tendo sido vanguardista da Medicina Intensiva (Hannah Wunsch, 2020)(Centers for Disease Control and Prevention, 2019c).

Numa tentativa preventiva de doença grave, a amantadina é aprovada pela FDA em 1960. Nos anos 90, a Rimantidina, um análogo da amantadina, é aprovada para a terapêutica do vírus *Influenza A*. A 14 dezembro de 2000, o Oseltamivir surge e é aprovado pela FDA e protocolado para uso clínico no controlo de dias de doença pela Influenza (Centers for Disease Control and Prevention, 2019c).

No quadro 1 está apresentada a informação sintetizada da cronologia e lições aprendidas durante as diferentes epidemias/pandemias pela Influenza.

Quadro 2: Representação esquemática da origem, número total de casos, número de mortes e lições aprendidas em cada uma das epidemias e pandemias do século XX e XXI

<p>Epidemia de 1889-1890 Gripe Russa ou Gripe Asiática (H3N2 ou H2N2)</p> <p>Origem: São Petersburgo, Rússia em Outubro de 1889 (Kempínska & Woźniak, 2013).</p>	<p>Pandemia de 1918-1920 Gripe Espanhola ou A Morte Azul (H1N1)</p> <p>Origem: Primeiro caso foi reportado em Espanha. No entanto, o primeiro caso possa ter surgido no Kansas (EUA) (Lemon & Mahmoud, 2005).</p>	<p>Pandemia de 1957-1958 Gripe Asiática (H2N2)</p> <p>Origem: Primeiros casos reportados em Singapura e Hong Kong (Centers for Disease Control and Prevention, 2019a).</p>	<p>Pandemia de 1968-1969 Gripe de Hong Kong (H3N2)</p> <p>Origem: Primeiros casos em Hong Kong e Sudeste Asiático (Centers for Disease Control and Prevention, 2019b).</p>	<p>Epidemia de 1977-1978 Gripe russa (H1N1)</p> <p>Origem: Os primeiros casos na China. No entanto, a Rússia foi a primeira a reportar os casos (Rozo & Gronvall, 2015).</p>	<p>Epidemia de 2004 Gripe das Aves (H5N1)</p> <p>Origem: Ásia em Dezembro de 2003. Maior surto de estirpe aviária do vírus <i>Influenza</i> (Trampuz et al., 2004).</p>	<p>Pandemia de 2009-2010 Gripe Suína (H1N1 pdm09)</p> <p>Origem: Primeiro caso reportado na Califórnia (Centers for Disease Control and Prevention, 2009)</p>
<p>Número de casos e mortalidade global: Dados não clarificam o número total de casos/mortes. A faixa etária entre os 15-24 anos com registo de maior número de mortes (Kempínska & Woźniak, 2013).</p>	<p>Número de casos e mortalidade global: Estimam-se cerca de 50-100 milhões de casos de morte. Número de casos total 350 milhões. A faixa etária dos 15-40 anos mais afetada (Lemon & Mahmoud, 2005).</p>	<p>Número de casos e mortalidade global: Estima-se 1 milhão de casos de mortos (Centers for Disease Control and Prevention, 2019b). Dados não encontrados no número total de casos de infeção.</p>	<p>Número de casos e mortalidade global: Casos severos na faixa etária menor que 26 anos (Rozo & Gronvall, 2015). Dados não encontrados relativos ao número total de vítimas e mortes.</p>	<p>Número de casos e mortalidade global: Mais de 100 milhões de aves mortas. Em março de 2004, na Tailândia, foram reportados 32 casos em humanos, sendo que 22 morreram (70% taxa de mortalidade (Trampuz et al., 2004).</p>	<p>Número de casos e mortalidade global: Aproximadamente 59 milhões de casos. 12 mil mortes. A faixa etária dos 18-64 anos foi a que registou maior número de casos positivos e mortes. (15)</p>	
<p>Lições do evento: - Maior número de casos foi associado a locais mais povoados e onde os meios de transporte estavam a expandir-se massivamente. - Pessoas com comorbidades cardíaca e respiratória tinham significativa suscetibilidade para a severidade da Influenza. (Kempínska & Woźniak, 2013).</p>	<p>Lições do evento: - A faixa dos 20-40 anos mais afetada. (60% das mortes nos campos de combate e locais sobrepovoados) *. Locais com idosos afetados: significativa taxa de mortalidade. Idosos menos afetados: pandemia de 1889 passível de ter dado imunidade*. - Morte azul por doentes apresentarem cianose e hemorragias internas/externas antes da morte*. *(Lemon & Mahmoud, 2005)</p>	<p>Lições do evento: - Menor severidade que pandemias prévias. - Vacinas foram administradas após a pandemia de 1957: obrigatória nos centros militares, idosos, grávidas e doentes com doenças crónicas*. - Fluidoterapia era administrada*. - Amantadina foi aprovada em 1966*. *(Centers for Disease Control and Prevention, 2019c) - Teste de deteção de Hemaglutinina foi usado no diagnóstico em serviços militares (Centers for Disease Control and Prevention, 2013c).</p>	<p>Lições do evento: - Os jovens foram mais afetados porque não tinham imunidade da estirpe circulante H1N1 dos anos 50 (Rozo & Gronvall, 2015). - Discute-se: a influência de mutações laboratoriais no aparecimento da estirpe virulenta; a Influenza tenha sido usado como arma biológica na guerra da União Soviética e a mutação na produção das vacinas vivas atenuadas (Rozo & Gronvall, 2015).</p>	<p>Lições do evento: - As estirpes aviárias têm grande dificuldade em replicarem-se em humanos*. - Migração de aves crucial na propagação de estirpes aviárias da influenza*. - Em 1997 associou-se mercados de venda de aves vivas como reservatórios de mutação do vírus <i>Influenza</i>, aplicando-se na epidemia de 2004*. *(Centers for Disease Control and Prevention, 2019b) - Maioria das infeções é zoonótica (Centers for Disease Control and Prevention, 2020a).</p>	<p>Lições do evento: - Um mês após a conformação do primeiro caso, desenvolve-se vacina do vírus <i>Influenza</i> adequada à estirpe*. - Publica-se o genoma viral dois meses após início da pandemia.* - Obesidade foi declarada fator de risco para severidade*. *(Centers for Disease Control and Prevention, 2009) - Surgem casos de resistência a Oseltamivir (Centers for Disease Control and Prevention, 2020a). - Teste de RT-PCR surge no diagnóstico de casos de Influenza (Uyeki, 2009).</p>	

Dados colhidos da seguinte bibliografia - (Kempínska & Woźniak, 2013) (Lemon & Mahmoud, 2005); (Centers for Disease Control and Prevention, 2019a); (Viboud et al., 2015); (Centers for Disease Control and Prevention, 2013b); (Centers for Disease Control and Prevention, 2019c); (Centers for Disease Control and Prevention, 2013a); (Centers for Disease Control and Prevention, 2013c); (Centers for Disease Control and Prevention, 2019b); (Eickhoff & Meiklejohn, 1969); (Rozo & Gronvall, 2015); (Trampuz et al., 2004); (Centers for Disease Control and Prevention, 2020a); (Centers for Disease Control and Prevention, 2009); (Uyeki, 2009).

IV. Virologia da Influenza

IV.1. Classificação e Morfologia viral

O vírus *Influenza* pertence à família *Orthomyxoviridae* e possui 4 géneros que são o vírus *Influenza A*, vírus *Influenza B*, vírus *Influenza C* e vírus *Influenza D* que afetam o ser humano, mamíferos e aves. A sequenciação viral permitiu verificar que os vírus *Influenza A*, B e C partem do mesmo antecessor e que se tornam, à posteriori, geneticamente diferentes por rearranjo e troca de segmentos de RNA entre os vírus do mesmo género ou tipo. O Vírus *Influenza D* foi isolado pela primeira vez em 2011 em suínos e bovinos e é geneticamente idêntico ao vírus *Influenza C*, tendo sido inicialmente considerado um subtipo do vírus *Influenza C* (Lamb, R. A., & Krug, 1996)(Su, Fu, Li, Kerlin, & Veit, 2017). A nomenclatura do vírus *Influenza* inclui: o tipo, espécie onde foi isolado (caso seja não-humano), local, número da estirpe, ano e, caso seja vírus *Influenza A* o subtipo das glicoproteínas Hemaglutinina/Neuraminidase (HA/NA). A título de exemplo a pandemia de Bangkok em A/Bangkok/1/1979 (H3N2) (Lamb, R. A., & Krug, 1996).

Os vírus *Influenza A* (H1N1 e H3N2) e os vírus *Influenza B* são os protagonistas na sazonalidade da Influenza (Su et al., 2017). Anualmente, os vírus *Influenza* endémicos afetam 35.5 milhões de pessoas mundialmente, provocando em média 650 000 mortes no mundo cuja taxa de mortalidade estimada na Europa corresponde a 11% (WHO, n.d.-a).

Não se reportaram casos de doença grave em humanos pelo vírus *Influenza C* e D, no entanto, o vírus *Influenza C* já causou sintomatologia da Influenza em crianças e, em alguns casos, cursou com hospitalizações (Su et al., 2017).

Na figura 1 está representada a cinética dos vírus *Influenza A* epidémicos e pandémicos no século XX e XXI.

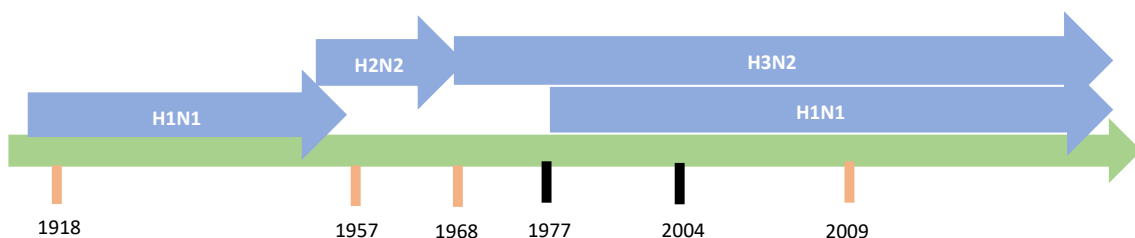


Figura 1: Cronologia da circulação do vírus Influenza A - Representação a laranja das pandemias e a preto das epidemias históricas com as variantes do vírus *Influenza A* circulantes no momento. Atualmente, as variantes H3N2 e H1N1 são as responsáveis pela circulação sazonal do vírus Influenza A. Fonte de dados: (Krammer et al., 2018)

Quanto à sua morfologia, o vírus *Influenza* é esférico ou filamentosos com de cerca de 100 nm de diâmetro e 300 nm de comprimento, respectivamente (Lamb, R. A., & Krug, 1996).

A cápsula do vírus *Influenza A* é lipídica e com glicoproteínas *spike* HA e NA em proporção de 4:1. Tem um menor número de canais de iões M2 que atravessam a cápsula lipídica de proporção M2/HA de $10^1/10^2$ moléculas (Lamb, R. A., & Krug, 1996). O envelope viral, onde se localizam as glicoproteínas HA, NA e M2, envolve a proteína de matriz M1 encerrando o núcleo do virião. Internamente à proteína M1 são encontradas as proteínas exportadoras (NEP) ou proteína não-estrutural 2 (NS2), o complexo da ribonucleoproteína (RNP) – que contém segmentos de RNA viral cobertos pela nucleoproteína (NP) - e a RNA polimerase heterotrimérica RNA-dependente com 2 polimerases básicas e subunidades de ácido polimerase PB1, PB2 e PA (Zebedee & Lamb, 1988). A estrutura do vírus *Influenza B* é semelhante à do vírus *Influenza A*, exceto que este tem 4 proteínas no envelope viral (as NB e BM2 que substituem as HA, NA, M2) (Zebedee & Lamb, 1988).

Os vírus *Influenza A* e B têm 8 cadeias de RNA viral (vRNA) de fita única de sentido negativo. As cadeias genéticas dos vírus *Influenza* são organizadas helicoidalmente e ligadas ao complexo heterotrimérico RNA polimerase (Baudin, Bach, Cusack, & Ruigrok, 1994). Por sua vez, a numeração das cadeias de RNA é feita por ordem decrescente de comprimento das fitas. Em todos os vírus *Influenza A* e B, a subunidade polimerase PB1 é feita no segmento 2. Os segmentos 1, 2, 3, 4 e 5 nos vírus *Influenza A* e B traduzem as proteínas PB2, PA, HA e NP, respectivamente. A tradução da proteína NA do vírus *Influenza A* é feita no segmento 6, ao passo que no vírus *Influenza B* há a tradução da proteína NA e da proteína de matriz NB no segmento homónimo (que no *Influenza A* corresponde ao canal de iões M2) (Hatta & Kawaoka, 2003). O segmento 7 nos vírus *Influenza A* e B serve para completar a tradução do canal de iões M2 e da proteína de matriz M1 (R. A. Lamb, Lai, & Choppin, 1981). Por último, no segmento 8 nos vírus *Influenza A* e B ocorre a expressão da proteína NS1 e por *splicing* RNA da proteína NEP/NS2 (envolvida na exportação de RNP viral do núcleo das células do hospedeiro) (Dauber, Heins, & Wolff, 2004)(Briedis & Lamb, 1982). Na figura 2 encontra-se a representação visual da estrutura do vírus *Influenza A* como a organização dos segmentos genéticos.

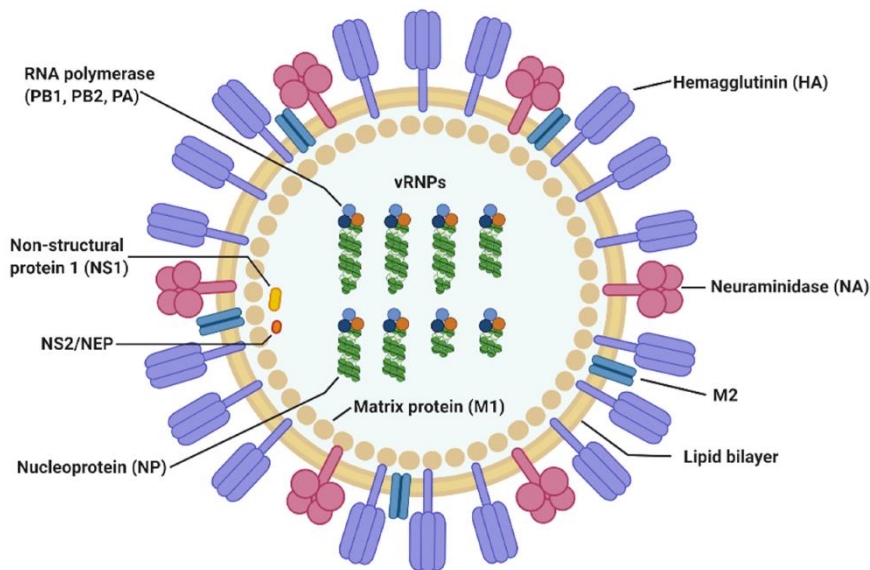


Figura 2: Representação visual do vírus *Influenza A* - Membrana lipídica constituída pelas glicoproteínas HA, NA e M2. Internamente a encerrar o virião, a proteína da matriz (M1). As proteínas exportadoras (NEP) ou proteína não-estrutural 2 (NS2). A RNA polimerase com as proteínas PB1, PB2 e PA. Fonte de dados e imagem: (Jung & Lee, 2020)

A estrutura do vírus *Influenza C* difere dos vírus *Influenza A* e *B*. Estruturalmente possui duas proteínas distintas: a proteína Hemaglutinina-esterase-fusão (HEF) e Proteína CM2. A proteína HEF localiza-se no segmento genético 4 do vírus *Influenza C* são o alvo da resposta dos anticorpos neutralizadores mimetizando a função das glicoproteínas HA e NA (dos vírus *Influenza A*) e das proteínas NB e BM2 (dos vírus *Influenza B*). Tem um canal de iões CM2 no envelope viral que se localiza no segmento genético 6. Nos segmentos de 1 – 3 encontram-se as subunidades da polimerase PB2, PB1 e P3, respetivamente. No segmento 5 localiza-se a proteína NP. Por último, a proteína NEP no segmento 7 que é responsável pela exportação dos nucleótidos virais (K. Sederdahl, 2020).

Por sua vez, o vírus *Influenza D* é estruturalmente idêntico ao vírus *Influenza C*, exceto que existem alterações dos nucleótidos nos segmentos constantes que promovem a transcrição viral e a presença da proteína NS1 no segmento 7 viral, que substitui a proteína NEP do vírus *Influenza C* (Su et al., 2017).

IV.2. Tropicismo e Mecanismo de replicação dos vírus *Influenza A e B*

Ligação viral às células do hospedeiro

Os vírus *Influenza* ligam-se aos recetores de ácido siálico das células do hospedeiro localizadas em glicocomplexos nas membranas celulares encontrados no trato respiratório. A glicoproteína HA liga-se aos terminais α -2,3-ligando do ácido siálico das células do hospedeiro permitindo assim a conexão do vírus *Influenza* às células. Comumente, as porções de ácido siálico das células do hospedeiro localizam-se no epitélio respiratório (J.Nelson S.S. Couceiro, 1993). Porventura, os vírus *Influenza* cursam maioritariamente com doença respiratória superior devido ao menor número de recetores de ácido siálico no epitélio pulmonar e, conseqüentemente, há menor probabilidade de acesso viral às membranas das células epiteliais pulmonares do hospedeiro. No entanto, quando o epitélio do pulmão é afetado cursa com patologia respiratória severa e rapidamente progressiva (J.Nelson S.S. Couceiro, 1993).

A glicoproteína HA tem duas porções: o segmento *stem* constante na base de HA; a porção superior com potencial mutacional correspondendo ao ligando do recetor do ácido siálico sendo responsável pela internalização viral nas células do hospedeiro como é reconhecível pelo sistema imunitário. (Steinhauer, 1999).

Entrada viral nas células do hospedeiro

Após a ligação da glicoproteína HA às células do hospedeiro, o vírus internaliza-se em vesículas endossomais. A fusão do envelope viral à membrana endossomal aliada ao baixo pH das vesículas endossomais, que induzem uma alteração conformacional da glicoproteína HÁ, são cruciais na libertação dos nucleotídeos virais para o citoplasma da célula hospedeira (Steinhauer, 1999). Por sua vez, os iões de hidrogénio do endossoma entram no vírus *Influenza* pelo canal de iões M2 cursando com acidificação do virião o que auxilia a libertação dos nucleótidos virais no citoplasma celular do hospedeiro. O medicamento Amantidina atua na proteína M2 bloqueando o canal de entrada de iões, limitando o “despir” do vírus (Pinto, Holsinger, & Lamb, 1992).

Síntese de proteínas virais

As proteínas do envelope viral (HA, NA e M2) são sintetizadas nas membranas ribossomais e retículo endoplasmático a partir do mRNA viral. De seguida, as proteínas HA, NA e M2 são transportadas para o complexo de Golgi e sofrem alterações pós-conformacionais. Na porção superior do complexo das proteínas HA, NA e M2 existem ligandos que lhes permitem ligar à membrana do virião. Sabe-se pouco sobre a produção das proteínas do citoplasma viral, mas projetou-se que a proteína M1 tenha um papel importante na ligação entre o complexo RNP-NEP e as proteínas do envelope viral na membrana da célula do hospedeiro (Pappas et al., 2008). Pensava-se que a organização do RNA viral era aleatória, no entanto, estudos recentes mostram que o processo é seletivo, em que sinais discretos no RNA viral permitem a incorporação de todo o RNA no vírus *Influenza* (Fujii, Goto, Watanabe, Yoshida, & Kawaoka, 2003). A Ribavarina inibe a atividade da RNA polimerase viral e o Baloxavir Marboxil liga-se à porção PA da RNA polimerase que, conseqüentemente, freiam a produção de proteínas virais (Jackson, Roberts, Wang, & Belshe, 2000)(O’Hanlon & Shaw, 2019).

Saída do vírus da célula do hospedeiro

O vírus *Influenza* é apenas contagioso quando tem na sua constituição todos os componentes da sua estrutura (Fujii et al., 2003). A formação do vírus *Influenza* inicia-se na célula lipídica bilaminar, sendo que o mecanismo é induzido pela proteína M1 viral (Fujii et al., 2003). Quando o envelope viral está fechado, a glicoproteína HA fica ligada ao ácido siálico da célula do hospedeiro até que o vírus seja libertado da célula pela atividade da sialidase da proteína NA. Quando a proteína NA está inativada/ausente, a infetividade viral é conseqüentemente menor. Paralelamente, a proteína NA permite remover os resíduos de ligação ao ácido siálico para prevenir a agregação viral às células e aumentar a infetividade (Fujii et al., 2003). Pensa-se que a proteína NA contribua na destruição de mucinas do trato respiratório, o que permite aumentar a penetração viral no epitélio respiratório (Matrosovich, Matrosovich, Gray, Roberts, & Klenk, 2004). Os inibidores da Neuraminidase, como o Oseltamivir e o Zanamivir, inibem a atividade da glicoproteína Neuraminidase e impedem a saída do vírus das células hospedeiras (Jackson et al., 2000).

IV.3. Resposta imunológica

Sistema imunitário inato

Quando o vírus *Influenza* invade as vias aéreas e replica-se, o sistema imunitário inato é o primeiro a responder ao estímulo que reconhece *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) pelos seus *pattern recognition receptors* (PRRs). O principal PAMPs dos vírus RNA é a terminação 5' RNA. No entanto, estudos indicam que no vírus RNA a terminação 5' RNA tenha menor influência na ativação da cascata e, conseqüentemente, na indução da resposta imunitária (Hale et al., 2010). A ativação das PRRs permite a secreção de citocinas pro-inflamatórias e INF tipo I pelas células epiteliais infetadas do hospedeiro. Paralelamente, as células *natural killer* (NK) reconhecem a glicoproteína HA e lisam o vírus. Os neutrófilos migram para o local da infecção estimulando a fagocitose e desgranulação das células infetadas. Os macrófagos alveolares são os principais responsáveis pela produção do IFN I durante a infecção por vírus RNA e essenciais na homeostase pulmonar durante infecção pelo vírus *Influenza*. Estudos evidenciam que o excesso de células do sistema imunitário inato predispõe para o desenvolvimento de quadro severo de infecção por Influenza (Jung & Lee, 2020).

As células dendríticas (CDs) são responsáveis pela simplificação e ativação de células T *naive*, servindo como conexão entre o sistema imunitário inato e imunidade adaptativa. No caso de infecção pela Influenza, as CDs no epitélio pulmonar migram para os gânglios linfáticos com o sinal do antígeno viral para apresentação do antígeno às células T *naive*. Assim, as CDs são responsáveis pela ativação das células T CD8+, indução de resposta em células CD4+ e subsequente eliminação viral pelas células T. (R. A. Lamb et al., 1981).

A resposta imunitária inata é importante na resposta à infecção ao vírus *Influenza*. No entanto, a resposta imunitária adaptativa é crucial para a eliminação viral, recuperação e proteção de reinfeção. As glicoproteínas HA e NA são os principais alvos da imunidade adaptativa (Jung & Lee, 2020).

Sistema imunitário adaptativo

As glicoproteínas HA e NA são os antigénios virais cruciais na indução da resposta imune adaptativa à Influenza (Bahadoran et al., 2016). A porção globular da glicoproteína HA (porção superior da glicoproteína) é responsável pela neutralização viral e, por sua vez, induz maior produção de anticorpos comparativamente à porção *stem* da glicoproteína HA, glicoproteína NA e as proteínas internas (Bahadoran et al., 2016).

As células CD4⁺ reconhecem os antigénios do vírus *Influenza* apresentados pelo complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) para a produção de citocinas, ativação de anticorpos e indução de resposta de células T *helper*, que são cruciais na produção de anticorpos (Jung & Lee, 2020). Estudos realizados em ratos mostraram que a resposta das células CD4⁺ atinge o pico ao 10^o dia após inoculação pelo vírus *Influenza* (Jung & Lee, 2020).

Os linfócitos Th1 e Th2 são induzidos após infeção pelo vírus *Influenza*. Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ , IL-2 e Fator α de necrose tumoral (TNF α), cujas estimulam a ativação de macrófagos, das células B que produzem anticorpos IgG2 e IgG3 e medeiam a resposta imunitária celular. As células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 e promovem a produção de outros anticorpos nas células B, como IgG1 e IgE. Com efeito, os linfócitos Th1 estão mais associadas à taxa de sobrevivência por infeção à Influenza quando comparadas com as células Th2 (Jung & Lee, 2020).

As células Th17 podem inibir a atividade tanto das células Th1 como de citocinas produzidas durante a infeção pelo vírus *Influenza*, podendo contribuir para a persistência e exacerbação da infeção viral (Jung & Lee, 2020). No entanto, constatou-se que durante a infeção pelo vírus *Influenza* as células Th17 estimularam uma regulação da resposta imune do hospedeiro nas células infetadas, como foi observado num estudo em ratos em que ocorreu uma diminuição da inflamação do epitélio pulmonar coordenada pela IL-17 (Martinez et al., 2012). Por sua vez, as células T reguladoras (Tregs) têm ação crucial na proteção após a infeção pelo vírus *Influenza* ao induzir imunossupressão (o que permite controlar a resposta imunitária) e contribuem na reparação de tecidos (Jung & Lee, 2020).

As células CD8⁺ são induzidas pelas células CD4⁺ e reconhecem os antigénios virais pelo MHC I das células apresentadoras de superfície viral de antigénio (Jung & Lee, 2020). Estudos mostram que um atraso da resposta das células CD8⁺ associa-se a maior

severidade de Influenza (Jung & Lee, 2020). As células CD8+ citotóxicas (CTLs) eliminam o vírus pela via citólise ao produzir perforinas que permeabilizam as membranas das células do hospedeiro infetadas e granzimas para a sua apoptose. As CTLs têm o ligando Fas que se conecta ao recetor Fas das células infetadas e, assim, induzem apoptose pela cascata de caspases. O TNF produzido pelas CTLs é outra via da citotoxicidade ao ligar-se aos recetores dependentes de TNF nas células infetadas. Por último, as células T efectoras CD8+ produzem Interleucina-10 (IL-10), Interferão- γ (IFN- γ) e TNF α para a regulação da inflamação pulmonar durante infeção por Influenza (Jung & Lee, 2020). Na figura 3 está representada a esquematização da indução da resposta imune adaptativa aquando da infeção pelo vírus *Influenza*.

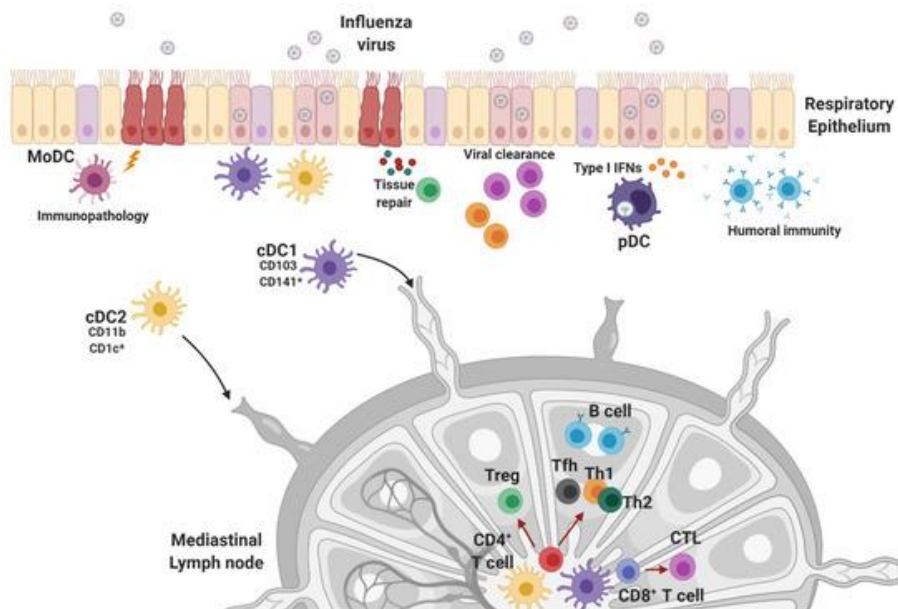


Figura 3: Ativação e ação das células dendríticas (CDs) - As CDs após ativadas pela resposta ao antígeno viral deslocam-se para os gânglios linfáticos para a estimulação da resposta imunitária adaptativa. As células dendríticas 1 e 2 têm capacidade de induzir resposta às células T CD8+ e CD4+. cDC1(células dendríticas tipo 1), cDC2 (células dendríticas tipo 2), CTL (células citotóxicas), Treg (células T reguladoras). Fonte da imagem: Artigo da revista MDPI (Jung & Lee, 2020).

Imunidade humoral

As células B *naïve* sofrem diferenciação para células B produtoras de anticorpos (AFCs) após o contacto com a informação do antígeno até 3 dias após-inoculação e iniciam a produção de anticorpos Imunoglobulina G (IgG) ao 7º dia após-infeção pelo vírus *Influenza*. Os anticorpos naturais Imunoglobulina M (IgM) independentes de antígeno são os primeiros a neutralizar a atividade e medeiam a atividade imunitária humoral na fase inicial. Os anticorpos produzidos ligam-se principalmente à extremidade superior globular da proteína HA e da proteína NA inibindo a entrada do vírus nas células do hospedeiro, processo denominado de neutralização (Gentles, Wan, Eichelberger, & Bloom, 2020). Os anticorpos também ligam-se à porção *stem* da proteína NA e proteína M2 impedindo a replicação viral ao inibir a sua atividade enzimática. Por sua vez, os anticorpos da porção *stem* de HA, da proteína M2 e NA conseguem induzir resposta às células trigger efectoras (FC células). Os anticorpos da haste de HA induzem ativação do complemento e consequente eliminação das células infetadas. Assim, os anticorpos específicos do vírus *Influenza* medeiam a citotoxicidade e fagocitose, contribuindo para a eliminação das células infetadas. (Jung & Lee, 2020). Na figura 4 demonstra o mecanismo de ação dos anticorpos do indivíduo à infeção pelo vírus *Influenza*.

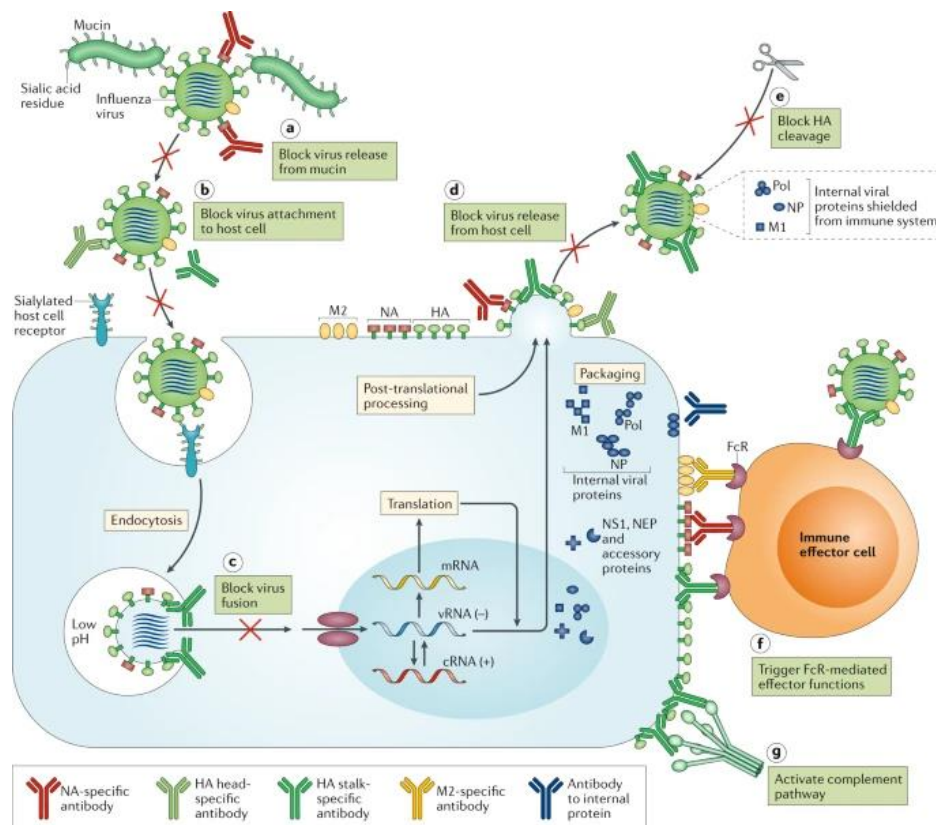


Figura 4: Mecanismo de ação dos anticorpos à infeção pelo vírus Influenza - Ação dos anticorpos produzida pelas células B nas células do hospedeiro infetadas pelo *Influenza* – ação dos anticorpos específicos de NA, da porção globular superior de HA, haste de HA e das proteínas internas. cRNA, (copia RNA); M1 (proteína de matriz); NEP (proteína nuclear exportadora); NS1 (proteína não-estrutural 1); Pol (Polimerase); vRNA, (RNA viral). Fonte da imagem: (Taubenberger & Morens, 2008)

IV.4. Mutações virais

As inserções e/ou mutação de segmentos genéticos ocorrem durante a replicação de vírus com Ácido Ribonucleico (RNA) e na retrotranscrição constituindo características iminentes dos vírus. As mutações dos agentes patogénicos permitem a evolução viral como também evasão à resposta imunológica (Sanjuán et al., 2010) (Domingo, 1997).

O vírus *Influenza A* tem tendencialmente maior capacidade de contornar o sistema imunitário do indivíduo dada a taxa de mutação do vírus *Influenza A* ser superior quando comparados ao vírus *Influenza B* e vírus *Influenza C* (Nobusawa & Sato, 2006). O *antigenic-drift* é a denominação de alterações *minor* das glicoproteínas HA e NA surgem durante a replicação do vírus *Influenza* e conseqüentemente permite contornar os mecanismos da resposta ao sistema imunitário sendo que também justificam a pela sazonalidade anual do vírus *Influenza* (Kim, Webster, & Webby, 2018). As mutações das glicoproteínas tendem a ocorrer na porção superior das glicoproteínas HA e NA, sendo que a porção superior da glicoproteína HA é a que tem maior predisposição para mutar-se (Steinhauer, 1999)(Hale et al., 2010) (Kim et al., 2018). A glicoproteína HA é clivada por serina proteases dividindo-se em HA1 e HA2, sendo que a porção HA1 (que corresponde à porção globular ou superior da glicoproteína HA) é a que se modifica constantemente e é o principal responsável pela infetividade do vírus *Influenza*. (Steinhauer, 1999)(Hale et al., 2010).

Por sua vez, o *antigenic-shift* designa o mecanismo de alterações drásticas das glicoproteínas do vírus *Influenza* pela interação do vírus entre humanos e animais, permitindo o aparecimento de uma nova variante que vulnerabiliza a população pela ausência de imunidade adquirida para esta nova variante, cursando com aumento da transmissibilidade e predispondo a população ao aparecimento de pandemias (Kim et al., 2018). O *antigenic-shift* já ocorreu em vírus *Influenza A*, dado que se conhecem pandemias com reservatórios animais pelo que se desconhecem-se pandemias ao vírus *Influenza B* e vírus *Influenza C*. A título de exemplo, a pandemia de 1918 surgiu pela passagem da variante H1N1 de aves para os humanos, tendo vulnerabilizado a população e cursado com cerca de 50 milhões de mortes mundialmente (Hoag, 2014). Os agentes patogénicos possuem mecanismos naturais que lhes permite eliminar inserções e/ou mutações genéticas, como a reparação *Proofreading* e o *Mismatch*

Repair. Nos agentes patogénicos de Ácido desoxirribonucleico (DNA) existe o mecanismo de reparação *Proofreading* e consiste na deteção, eliminação e substituição de bases nucleicas erradamente inseridas por exonucleases encontradas nas DNA polimerases durante a replicação, como ocorre nas enzimas celulares de DNA polimerase da *Escherichia coli* (Domingo, 1997). Porventura, a estrutura das transcriptases reversas dos vírus RNA não têm a terminação de ligação das exonucleases, dificultando assim a atividade de reparação *Proofreading* e predispondo para a inserção de mutações durante a replicação viral (Domingo, 1997). O mecanismo de reparação por *Mismatch Repair* ocorre após a replicação dos agentes patogénicos e está presente em microorganismos com DNA e ausente nos de RNA (Domingo, 1997). Em suma, os mecanismos de reparação das mutações inseridas na informação genética são reduzidos nos agentes patogénicos RNA, o que contribui para a inserção de nova informação no código genético e, conseqüentemente, ao aparecimento de novas combinações de HA/NA (Domingo, 1997).

Os vírus RNA e retrovírus pertencem ao grupo com maior taxa de mutação contrastando os vírus DNA. A taxa de fidelidade de mutações expressa a capacidade mutacional do vírus. Por sua vez, taxas de fidelidade elevadas cursam maior capacidade de deleção de genes mutantes inseridos e a suscetibilidade a inserção de mutações é tendencial para taxa de fidelidade mutacional reduzida (Peck & Luring, 2018) (Sanjuán et al., 2010).

A taxa de fidelidade determina a conservação da replicação de informação genética pela polimerase. Por sua vez, a taxa de fidelidade dos agentes patogénicos varia entre diferentes classes dos microorganismos como no mesmo grupo taxonómico (Carrasco-Hernandez, Jácome, Vidal, & de León, 2017). Na figura 5 está representada a magnitude das taxas de mutação entre diversos microorganismos cuja grandeza da taxa de mutação das bactérias *Yersinia pestis* e *Escherichia coli* é de 10^{-10} , a do protozoário *Plasmodium falciparum* 10^{-9} e dos vírus RNA são de 10^{-5} mutações *per site per replication* (Carrasco-Hernandez et al., 2017).

No mesmo grupo taxonómico existem também diferentes taxas de mutações. Na figura 6 lustra a comparação da taxa de mutação dos RNA vírus dentro da mesma grandeza. Os vírus *Influenza* têm a maior taxa de mutação quando comparados com o coronavírus e a *Escherichia Coli* (WHO, 2021)(Lau et al., 2010)(Cattoli et al., 2011)(Klein, Serohijos, Choi, Shakhnovich, & Pekosz, 2014) (Reeves et al., 2011).

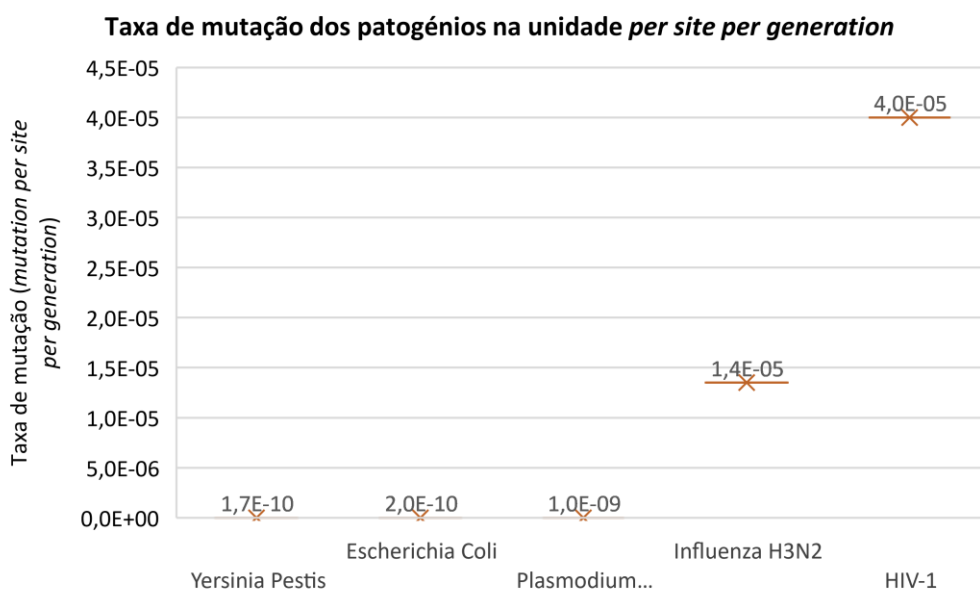


Figura 5: Taxa de mutação em diferentes patógenos *per site per generation* - Representação gráfica da taxa de mutação per site per generation de diferentes agentes patogênicos. Os vírus têm maior capacidade de mutação na sua replicação, sendo que o vírus H3N2 possui menor capacidade de mutação comparativamente ao HIV e maior taxa de mutação em relação à *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* e *Plasmodium falciparum*. Fonte dos dados: Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review (Carrasco-Hernandez et al., 2017).

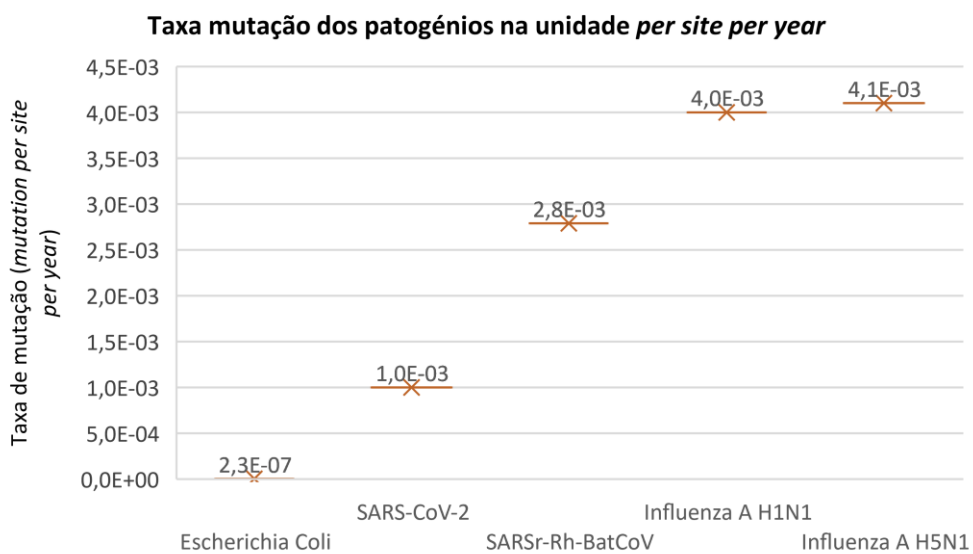


Figura 6: Taxa de mutação dos agentes patogênicos por unidade *per site per year* - Representação gráfica da taxa de mutação per site per year de diferentes agentes patogênicos. Os vírus RNA têm maior capacidade de mutação na sua replicação comparados com a bactéria *Escherichia coli*. O vírus *Influenza* possui maior taxa de mutação que o coronavírus. Fonte dos dados: Artigos: (WHO, 2021)(Lau et al., 2010)(Cattoli et al., 2011)(Klein et al., 2014) (Reeves et al., 2011).

Em suma, as bactérias e protozoários têm uma taxa de mutação menor correspondendo à ordem de 10^{-10} e 10^{-9} , respectivamente, ao passo que a taxa de mutação dos vírus corresponde à ordem de 10^{-5} *per site per generation*. Por sua vez, o vírus *Influenza* tem maior taxa de mutação comparativamente ao vírus SARS-CoV-2 e SARS-Rh-CoV, correspondendo a 4×10^{-3} per site per year. Assim, as mutações do vírus *Influenza* são o principal fator que permite contornar e conseqüentemente diminuir a proteção imunitário do indivíduo ao vírus, permitindo uma replicação viral otimizada e vulnerabilizando o indivíduo a desenvolver quadro clínico da Influenza.

IV.5. Evasão Imunitária

O vírus *Influenza* tem mecanismos que lhe permite evadir do sistema imunitário inato e adaptativo.

Sistema Imunitário Inato

- A subunidade ácida da polimerase (PB)1–PB2 (PA) do complexo viral heterotrimérico é responsável pela mediação da atividade *cap-snatching* do RNA mensageiro (mRNA) do hospedeiro, essencial na transcrição do mRNA viral. É também responsável pela indução da morte celular o que estimula a libertação das cópias virais. Estudos sugerem que quando ocorre a morte celular induzida pela proteína PB1-F2 das células infectadas pelo vírus *Influenza*, dá-se a ativação da via fagocítica e resposta citotóxica reduzida, o que permite uma maior evasão viral ao sistema imunitário (Hale et al., 2010) (Naveed, 2019).
- As PAMPs são bioprodutos virais replicados nas células do hospedeiro que instigam a resposta imunitária. Estudos reportam que a encapsidação do RNA viral da proteína viral NP para RNPs limita o acesso de RIG-I (alvo do IFN-I ao antígeno viral) , evadindo assim ao sistema imunitário (Hale et al., 2010).
- A proteína NS1 do vírus *Influenza* tem revelado ter ação neutralizante do mecanismo da produção do IFN, citocinas e recetores indutores da migração das CDs para os nódulos linfáticos. A proteína NS1 é responsável por contornar a ativação transcricional RIG-I mediada pela ubiquitina E3, prevenção da ubiquitinação RIG-I por TRIM25 e subsequente inibição da expressão genética do IFN- β , como do ATF-2/c-Jun (fator de

ativação e transcrição), IFR-3 (fator-3 regulador de Interferão) e NF- κ B (fator nuclear). Por sua vez, bloqueia a exportação do mRNA do núcleo pela inibição da maquinaria da exportação do mRNA. Para além disso, a proteína viral NS1 usa as proteínas PB1-F2 e PB2 no bloqueio da síntese de IFN- β , o que permite a inibição da apoptose das células infetadas e subsequente replicação (Hale et al., 2010)(Naveed, 2019).

→ Estudos reportam que a ligação da proteína NS1 do vírus *Influenza* não permite também uma maturação adequada das CD4 e CD8 ao interferir no mecanismo de transcrição do IFN- β e, como consequência, uma menor produção de marcadores inflamatórios. Por sua vez, inibe os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 que participam na transcrição do IFN- β e da produção das citocinas, sendo a IL-8 mais atingida pelo processo. A proteína NS1 previne a ativação das células T ao influenciar a recrutação das citocinas e, consequentemente, ocorre menor taxa de maturação das CD4 e CD8. Estudos recentes têm sugerido que quando as células são infetadas com a proteína NS1 ocorre a ativação do sistema imune adaptativo pelas células TH1 que, consequentemente, ocorreu maior estimulação das células CD8+ e resposta ligeira das células CD4+. Como tal, a proteína NS1 tem sido estudada como alvo nas vacinas vivas atenuadas pelo impacto da ausência da proteína NS1 e da resposta do sistema imunitário aumentada (Fernandez-Sesma et al., 2006).

Sistema Imunitário Adaptativo e Humoral

As glicoproteínas HA e NA são fundamentais na estimulação da resposta imunitária adaptativa (van der Sandt, Kreijtz, & Rimmelzwaan, 2012). Pela diminuída ou ausência de atividade intrínseca de *proofreading* da RNA polimerase na transcrição do RNA viral e da atividade de *Mismatch Repair*, existe maior predisposição para inserção de mutações e subsequente integração de nucleótidos anómalos (van der Sandt et al., 2012). Assim, permite que ocorra o *antigenic-drift* durante a replicação do vírus *Influenza* e, em casos de alterações *major* como o rearranjo das glicoproteínas entre vírus *Influenza* diferentes, permite que ocorra o *antigenic-shift* que, consequentemente, facilita o vírus *Influenza* a contornar os anticorpos neutralizadores produzidos pelo hospedeiro (van der Sandt et al., 2012).

Embora exista a produção de anticorpos durante a infeção pelo vírus *Influenza A*, estudos têm demonstrado que a produção de anticorpos contra a glicoproteína HA

durante a infecção natural é dependente da exposição prévia da combinação de HA/NA (Oltz, 2019). Por conseguinte, o conceito de *original antigenic sin* (OAS) demonstra a determinação da dominância da produção de anticorpos ser dependente das primeiras exposições ao vírus *Influenza* (Bahadoran et al., 2016)(Oltz, 2019). O mecanismo subjacente do OAS é associado ao *imprinting* da informação viral no sistema imunitário aquando da primeira exposição à infecção e/ou vacinação, limitando a produção de anticorpos neutralizadores para a variante presente no indivíduo (Krammer, 2019) (Oltz, 2019).

Para além da evasão da resposta aos anticorpos dada a alta taxa de mutação do vírus *Influenza*, permite também que ocorra uma evasão à resposta das células T e, assim, limitar a cascata de neutralização viral (Oltz, 2019). Assim, ocorrem mutações no epítoto das CTLs como do recetor das células T (TCR), o permite ao vírus não ser reconhecido e evada o sistema imunitário (van der Sandt et al., 2012).

Assim, os mecanismos de evasão do vírus *Influenza* ao sistema imunitário permitem que o vírus se propague e surja anualmente cursando com morbidade e mortalidade considerável (WHO, n.d.-b).

IV.6. Epidemiologia

Os vírus *Influenza A* e vírus *Influenza B* são os protagonistas pelas épocas epidémicas anuais, sendo o vírus *Influenza A* o mais frequente e responsável pela maior taxa de hospitalizações, sendo que na época de 2018-2019 na Europa o vírus *Influenza A* detetaram laboratorialmente 99% de casos pela Influenza (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019) (Arnold S. Monto, 2008a). O vírus *Influenza C* circula concomitantemente com os vírus *Influenza A* e vírus *Influenza B* cursando com doença ligeira sendo que, de acordo com um estudo epidemiológico, 50% da população dos Estados Unidos, Brasil e na Europa apresentava anticorpos para o vírus *Influenza C* (Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, 2015). Os vírus *Influenza D* partilham 50% da informação genética do vírus *Influenza C*, desconhecendo-se até ao momento a sua real incidência (Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, 2015).

O vírus *Influenza A* circula em humanos como em suínos e aves, sendo que a sua capacidade zoonótica vulnerabiliza a população a epidemias e pandemias pela reduzida imunidade dos seres humanos às variantes provenientes de animais (Asha & Kumar, 2019). O reservatório dos vírus *Influenza B* é humano, sendo importante na Influenza anual mas não tendo predisposto os indivíduos a pandemias até à data (Asha & Kumar, 2019). Os vírus *Influenza C* foram associados a infeção nas crianças e também foram detetados em animais, tais como suínos, camelos e caninos (Asha & Kumar, 2019). Ao passo que o vírus *Influenza D* foi detetado também em suínos e caprinos, tendo sido detetados em reduzida incidência nos humanos (Asha & Kumar, 2019).

O vírus *Influenza* transmite-se por via de aerossóis e pelo contacto direto entre indivíduos (Centers for Disease Control and Prevention, 2020i). Os vírus *Influenza* circulam em todo o mundo e são caracterizados pela sua sazonalidade e no Hemisfério Norte o vírus *Influenza* surge no mês de Outubro prolongando-se até meados de Março cujo seu pico sazonal é entre Dezembro a Fevereiro (Centers for Disease Control and Prevention, 2020i). No entanto, nos trópicos (como em Singapura e Equador), verificou-se que o vírus *Influenza* circula durante todo o ano (Arnold S. Monto, 2008b).

As variantes do vírus *Influenza* que circulam anualmente são os vírus *Influenza A* e vírus *Influenza B*. Por sua vez, as variantes comuns da Influenza sazonal são o vírus *Influenza*

A H1N1 pdm09 e H3N2 como vírus *Influenza* B Yamagata e Victoria e vírus Influenza A e B não-especificados. Na figura 7 está representada as frequências de circulação dos vírus Influenza A e vírus Influenza B entre 2012 a 2021 na Europa de acordo com os dados da ECDC.

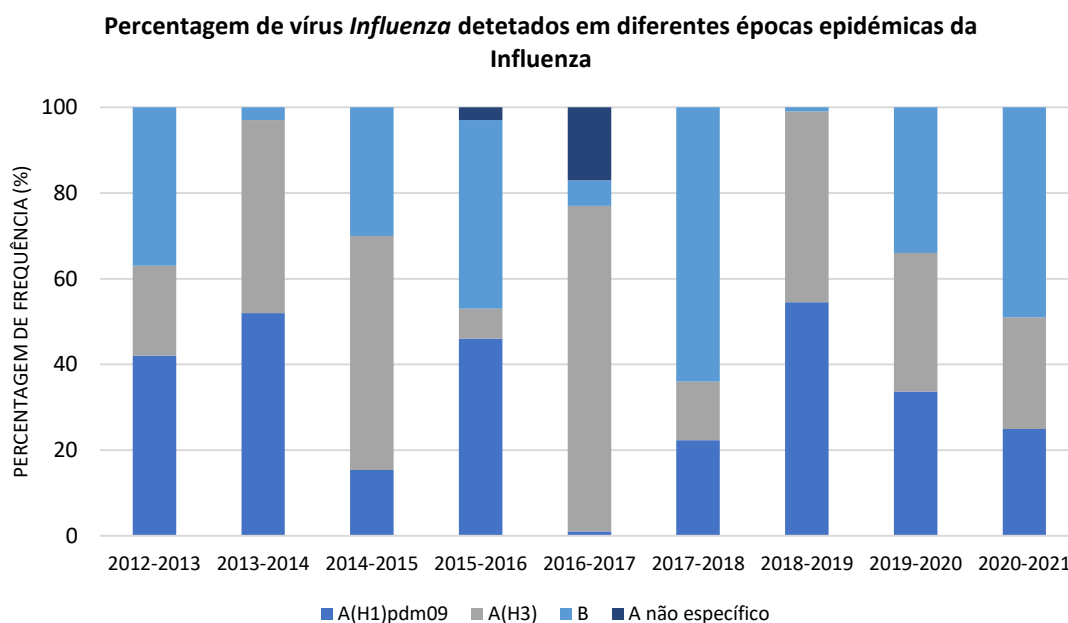


Figura 7: Percentagens anuais entre 2012 – 2021 das variantes do vírus Influenza circulante – Fonte de dados: (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2014)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2016a)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2016b)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2017)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2018b)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2020)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2020)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2021)

A Influenza é responsável por provocar doença respiratória ligeira a severa, dependendo da necessidade dos indivíduos de internamento hospitalar e das mortes ocorridas naquele ano. Na época de 2018-2019 registaram-se 35.5 milhões de casos da Influenza no mundo, sendo que desses ocorreram 490 600 hospitalizações e 34 200 mortes (Prevention, 2019). Por sua vez, na Europa o vírus *Influenza* é considerado um dos protagonistas de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) nas doenças infecciosas, juntamente com HIV, Tuberculose e Doença pneumococia invasiva (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a).

Em Portugal, na época de 2018-2019 estimou-se que a Influenza foi etiologia de infeção respiratória em 27% dos casos e o vírus respiratório sincicial em 9% dos casos numa amostra de 18521 casos da Influenza (Rodrigues, Silva, Torres, & Machado, 2019). Na

figura 8 está representada a incidência em Portugal do vírus *Influenza* na época de Inverno de 2018-2019 com registo estimado de percentagem de casos declarados do vírus da *Influenza* comparativamente aos restantes vírus como metapneumovírus, coronavírus, parainfluenza, bocavírus e adenovírus (Rodrigues et al., 2019).

Percentagem total de casos de infeção respiratória no Inverno da época de 2018-2019 em Portugal

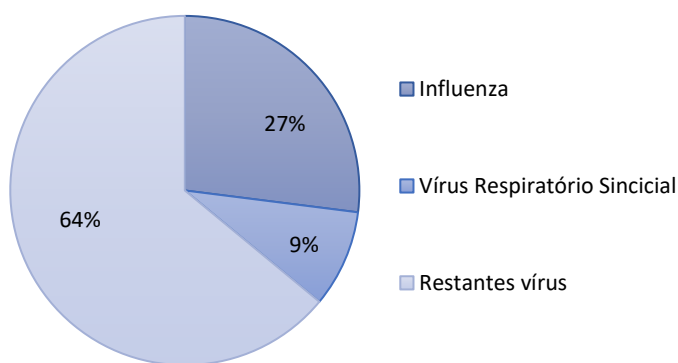


Figura 8: Percentagens das etiologias de infeção respiratória no Inverno na época de 2018-2019 em Portugal - representação da percentagem das incidências virais mais comuns na população portuguesa no inverno de 2018-2019 na causa de infeção respiratória. Os dados colhidos são provenientes da análise de cuidados de saúde primários e hospitalares. Fonte dos dados: A época do *Influenza* 2018-2019 (Rodrigues, Silva, Torres, & Machado, 2019).

Dos internamentos na Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) na época epidémica de 2018-2019, associou-se uma média de 6% de casos pela Influenza, cujo pico de casos ocorreu na semana 5 de 2019 e que correspondeu a 10% dos casos totais na UCI (Jorge, 2019).

O risco de complicações pela Influenza depende de comorbilidades e da faixa etária dos indivíduos. No quadro 2 estão representados os grupos de são considerados de risco nos EUA e na Europa.

Quadro 2: Representação esquemática dos grupos considerados de risco para complicações da Influenza em Portugal, Europa e nos EUA

Grupos de risco de severidade de Influenza		
Portugal	Europa	Estados Unidos da América
Idosos com mais de 65 anos	Idosos com mais de 65 anos	Idosos com mais de 65 anos
<u>Crianças com mais de 6 meses caso se tenham comorbilidades ou residentes em estruturas residências</u>	<u>Crianças entre 6 meses a 5 anos com comorbilidades</u>	<u>Crianças entre 6 meses a 5 anos tanto saudáveis como com comorbilidades</u>

Comorbilidades como:	Comorbilidades como:	Comorbilidades como:
<ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar crónica (Doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose quística ou bronquite crónica) e Asma Doenças neurológicas e do neurodesenvolvimento Doenças hematológicas Doenças endócrinas e metabólicas <u>Obesidade com IMC > 30 kg/m²</u> Doença cardiovascular Doença renal Doença hepática Comprometimento do sistema imunitário como infeção pelo vírus da Imunodeficiência humana, neoplasias e asplenia ou medicação como Quimioterapia e Radioterapia Transplantação Alterações genéticas <u>Jovens com < 19 anos sob acido acetilsalicílico</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar crónica (Doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose quística ou bronquite crónica) e Asma Doenças neurológicas e do neurodesenvolvimento Doenças hematológicas Doenças endócrinas e metabólicas <u>Obesidade com IMC > 40 kg/m²</u> Doença cardiovascular Doença renal Doença hepática Comprometimento do sistema imunitário como infeção pelo vírus da Imunodeficiência humana, neoplasias ou medicação como Quimioterapia e Radioterapia Alterações genéticas 	<ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar crónica (Doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose quística ou bronquite crónica) e Asma Doenças neurológicas e do neurodesenvolvimento Doenças hematológicas Doenças endócrinas e metabólicas <u>Obesidade com IMC > 40 kg/m²</u> Doença cardiovascular Doença renal Doença hepática Comprometimento do sistema imunitário como infeção pelo vírus da Imunodeficiência humana, neoplasias ou medicação como Quimioterapia e Radioterapia Alterações genéticas <u>Jovens com < 19 anos sob acido acetilsalicílico</u> <u>Antecedentes de AVC</u>
Grávidas e pós-parto (até 2 semanas após parto)	Grávidas e pós-parto (até 2 semanas após parto)	Grávidas e pós-parto (até 2 semanas após parto)
Institucionalizados	Institucionalizados	Institucionalizados
Profissionais de saúde	Profissionais de saúde	Profissionais de saúde

No quadro acima estão sublinhadas as diferenças nos grupos de risco considerados em Portugal, Europa e nos EUA. Fonte dos dados: (Centers for Disease Control and Prevention, 2021f)(European Centre for Disease Prevention and Control, n.d.-b)(Direção Geral da Saúde, 2020)

Os idosos com mais de 65 anos apresentam maior incidência de patologias crónicas e discência do sistema imunitário que, conseqüentemente, o vulnerabilizam para quadro severo da Influenza e morte. Estima-se que 70% - 85% das mortes pela Influenza e cerca de 50%- 70% das hospitalizações pela Influenza ocorram nos idosos com mais de 65 anos (Centers for Disease Control and Prevention, 2020b)(American, 2019).

As grávidas no 3º trimestre e até 2 semanas pós-parto têm maior risco de desenvolver Influenza severa e pneumonia fulminante com insuficiência respiratória quando comparadas com as restantes grávidas nas diferentes alturas de gestação e doentes não-

gravídicas (L.K., K., D.E., & J., 2018). Nas grávidas com diagnóstico positivo da Influenza ocorreu um maior risco de complicações fetais (como parto pré-termo, stress fetal e morte) (L.K. et al., 2018).

Por forma a ajustarem as medidas de Saúde Pública, Autoridades de Saúde das Doenças Infecciosas, como a *Centers Disease Prevention and Control (CDC)* e *European Centre Disease Prevention and Control (ECDC)*, reúnem-se anualmente com o intuito de preverem o risco de severidade da Influenza da época epidémica seguinte. O estudo da severidade da Influenza é feito pela análise da percentagem de visitas aos cuidados de saúde, as hospitalizações e percentagem de mortes por Influenza ocorridas em época de Influenza passadas. A escala de estatística informatizada *The Moving Epidemic Method (MEM)* é usada na tradução dos valores colhidos anteriormente de várias épocas epidémicas da Influenza e convertidas em taxas de intensidade estandardizadas (ITs) expressas em percentagens que exprimem a proporção de doentes com diagnóstico clínico e laboratorial de Influenza dos casos totais de síndrome que mimetiza a sintomatologia da Influenza durante o período epidémico em semanas (Rguig et al., 2020). Assim, existem 4 taxas estandardizadas de severidade da epidemia: 1. A taxa basal epidémica, 2. A taxa média de severidade; 3. A taxa alta de severidade e 4. A taxa muito alta de severidade. Comparando as várias épocas permite visualizar se as medidas de Saúde Pública aplicadas na prevenção da severidade da Influenza são adequadas na prevenção de doença severa (Centers for Disease Control and Prevention, 2018a)(Rguig et al., 2020).

IV.7. Apresentação Clínica

Sinais e sintomas da Influenza não complicada

O vírus *Influenza* cursa com quadro de doença respiratória aguda cujo pico de replicação é 24 a 48 horas após infecção. Habitualmente associa-se a quadro de faringite e traqueobronquite pelo tropismo às células do trato respiratório superior (Taubenberger & Morens, 2008). Assim, cursa com início súbito de febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$) cujo início é objetivável acompanhado de coriza, tosse, cefaleia, mialgias e por vezes prostração, vômitos e diarreia (Centers for Disease Control and Prevention, 2020c). Caso a infecção seja pelo vírus *Influenza A*, os sintomas podem surgir num intervalo de 1 a 8 dias após infecção, sendo que a mediana de início da sintomatologia é de 2 dias. Caso a infecção seja pelo vírus *Influenza B*, os sintomas tendem a surgir ao fim de 1 dia de infecção viral (Ramanathan et al., 2009).

Os sintomas mais comuns nos doentes com Influenza são mialgias, cefaleia, tosse, fadiga e rinorreia. A febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$) é um marcador importante no diagnóstico pediátrico da gripe. Em contrapartida, nos adultos a febre está presente em cerca de 68% dos casos com diagnóstico laboratorial positivo para Influenza e os calafrios surgem em 90% dos casos confirmados laboratorialmente. Por sua vez, o desconforto torácico pode surgir consequente à tosse e dispneia induzidos pela Influenza (A. S. Monto, Gravenstein, Elliott, Colopy, & Schweinle, 2000). No quadro 3 estão representadas as percentagens de frequência de sinais e sintomas da Influenza em idade adultas retiradas de um estudo observacional.

Quadro 3: Esquematização da proporção dos sintomas de 3744 participantes num estudo observacional feito no outono e inverno de 1994 – 1998

	Diagnóstico positivo da Influenza em adultos laboratorialmente confirmado (n=2470)	Diagnóstico negativo da Influenza em adultos laboratorialmente confirmado (n=1274)
Febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$)	68 %	40%
Sensação febril	90%	89%
Tosse	93%	80%
Congestão nasal	91%	81%
Fadiga	94%	94%
Anorexia	92%	86%
Odinofagia	84%	84%
Mialgia	94%	94%
Cefaleia	91%	89%

Representação dos sintomas de 2470 participantes testados positivos em laboratório para Influenza e 1274 participantes com diagnóstico laboratorial negativo para Influenza. Os dados colhidos provêm de ensaio clínico realizado no outono e inverno de 1994 – 1998. Fonte de dados: Sinais clínicos e sintomas que predizem infecção por Influenza (A. S. Monto et al., 2000).

Os sintomas pela Influenza não complicada resolvem-se completamente entre dias até 2 semanas após o início dos sintomas. No entanto, a febre pode durar até 7-10 dias após o início dos sintomas e a fadiga pode permanecer até semanas (Montalto, 2003)(Taubenberger & Morens, 2008).

Severidade da Influenza

A severidade de doença é definida como o impacto que a doença tem na saúde do indivíduo, como a extensão da doença e a necessidade de hospitalização, comorbilidades que advém da doença (como alterações que afetam o estado basal do doente) e a mortalidade (SpringerLink, 2013). Assim, a severidade da Influenza abrange a necessidade hospitalização por complicações como a traqueíte e/ou bronquite hemorrágica, bronquiolite descamativa, pneumonia viral primária, pneumonia bacteriana secundária, sépsis, choque séptico e, por último, morte como encefalite e/ou miocardite. Por sua vez, a morte de casos por pneumonia do vírus Influenza associa-se ao ARDS (Acute Respiratory Disease Syndrome) (Keilman, 2019). A complicação associado a Influenza severa em idade pediátrica é a laringotraqueíte (*Croup*) que cursa com aumento da morbidade dos doentes (Taubenberger & Morens, 2008).

Os estudos histológicos obtidos de autópsias consequentes à pandemia de 1918 observou-se a ocorrência de descamação e necrose do epitélio glandular da traqueia pela atividade fagocítica dos macrófagos, cujos explicam o eritema epitelial da mucosa respiratória e muco sanguinolento. Em 50% dos casos de Influenza mostraram ocorrer destruição multifocal e descamação do epitélio da traqueia e brônquios com marcado edema e a congestão da mucosa objetivável como traqueíte e bronquite hemorrágica (Taubenberger & Morens, 2008).

Nas vias aéreas mais estreitas, como os bronquíolos, as alterações podem ser mais significativas sendo que a bronquiolite descamativa cursa frequentemente com ulceração como a possibilidade de congestão pela infiltração de células mononucleares e necrose, explicando as hemorragias peribrônquicas e pneumonia peribrônquica (Taubenberger & Morens, 2008).

As alterações pulmonares consequentes a pneumonia pela Influenza são trombozes capilares e de pequenos vasos, edema intersticial, formação de membrana hialina nos alvéolos e ductos alveolares como hemorragia, lesão difusa com tecido necrosado e

metaplasia escamosa. Consequentemente, há compromisso das trocas gasosas e que semiologicamente traduz-se em cianose periférica e, por vezes, cianose central (Taubenberger & Morens, 2008). O síndrome de dificuldade respiratória aguda secundário à infecção pelo vírus *Influenza* cursa com o aparecimento de cianose periférica e/ou, ocasionalmente, cianose central como de alterações do sensório e expectoração hematopurulenta (Rothberg & Haessler, 2010).

A presença de neutrófilos na parede, por sua vez, é altamente sugestiva de infecção bacteriana secundária ou simultânea cuja é responsável pelo agravamento do quadro clínico e num possível desfeito fulminante (Taubenberger & Morens, 2008). Tipicamente o quadro de pneumonia bacteriana secundária surge com sinais e sintomas da Influenza sem resolução total em 2 semanas como a persistência de febre e da dispneia e tosse produtiva (Rothberg & Haessler, 2010).

IV.8. Diagnóstico

O diagnóstico da Influenza é frequentemente clínico baseando-se na sintomatologia do doente e na sua contextualização epidemiológica sendo possível pela avaliação dos sintomas cujo início ocorre entre 24 a 48 horas após infeção (D.W., J.J., & M.A., 2000). Estudos demonstram que o diagnóstico clínico da Influenza tem cerca de 85% de sensibilidade e 47% de especificidade, o que corrobora o seu uso em casos Influenza sem-complicações (Uyeki & Al., 2018). Habitualmente, os sintomas apresentam-se com calafrios, rinorreia clara, cefaleias, mialgias, fadiga e perda ponderal. No entanto, a febre de início súbito cuja data de início é objetivável com duração de mais de 12 horas e a tosse são sintomas fulcrais para o diagnóstico. Tipicamente, a febre e os sintomas sistémicos duram 3 dias com valores febris em cinética descendente (D.W. et al., 2000). Existem também exames complementares que são realizados na prática clínica e que permitem destrinçar a infeção bacteriana de viral, como a bioquímica geral com a contagem de leucocitária, Proteína C Reativa (PCR) e procalcitonina. A radiografia de tórax pode excluir e diferenciar diagnósticos caso haja sintomas respiratórios e febre elevada (Rodrigo & Méndez, 2012).

O diagnóstico laboratorial é feito caso haja influência no prognóstico e no tratamento do doente. Assim, os testes são feitos em indivíduos com condições crónicas (tais como compromisso do sistema imunitário, doença cardiovascular, renal, hepática, obesidade e Diabetes *Mellitus* tipo II), idosos com mais de 65 anos e grávidas ou no pós-parto por constituírem risco de desenvolver doença pelo vírus *Influenza* severa (Uyeki & Al., 2018). Nos meses fora da época endémica da Influenza (entre Novembro a Março), os testes de diagnóstico laboratorial podem ser feitos aquando da elevada suspeição clínica e caso haja importância no prognóstico do doente, como em doentes hospitalizados com clínica da Influenza e em indivíduos e crianças com compromisso do sistema imunitário (Uyeki & Al., 2018). O uso atempado dos testes de diagnóstico da Influenza auxilia a redução do uso de antibióticos e dos dias de doença pela administração atempada da terapêutica antiviral como orientação clínica adequada (Rodrigo & Méndez, 2012).

Os métodos de diagnóstico devem ter em consideração a avaliação do benefício do seu uso para o doente como 1. A performance técnica do teste (qualidade do teste e como vantagens e desvantagens do seu uso); 2. A capacidade diagnóstica do teste

(sensibilidade e especificidade do teste); 3. A probabilidade de detecção diagnóstica (valores preditivos positivos e negativos); 4. O benefício clínico do diagnóstico (rapidez de obtenção do resultado, existência de tratamento da doença e otimização das intervenções terapêuticas) (European Medicines Agency, 2007).

A qualidade do teste também depende do tipo de teste de diagnóstico usado, do processo de armazenamento da amostra e do tempo entre a colheita e a análise (Centers for Disease Control and Prevention, 2020e). As amostras devem obter-se com zaragatoas nasofaríngeas ou nasais e/ou faríngeas até 4 dias após-infecção viral. Caso não seja possível a sua colheita, o aspirado endotraqueal ou lavagem do fluído pulmonar podem ser realizados (Centers for Disease Control and Prevention, 2020e).

No contexto da Influenza existem testes de detecção de antígeno, de anticorpo e o teste de cultura viral. No quadro 4 estão representados o mecanismo, tempo de diagnóstico e características dos testes diagnósticos da Influenza disponíveis.

Quadro 4 – Representação dos testes de diagnóstico da Influenza

Alvo	Método	Mecanismo	Tempo de diagnóstico	Características
	Cultura viral	Inoculação das células infetadas em esfregaço de meio de cultura com albumina bovina, estreptomicina-penicilina, glucose e HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano ácido sulfónico) (World Health Organization, 2011)	3 – 10 dias	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizado no estudo de Saúde Pública (Kumar & Henrickson, 2012) - Especificidade e sensibilidade elevadas * - Deteta e diferencia os vírus <i>Influenza A</i> e <i>B</i> como os subtipos do vírus <i>Influenza A</i> * *(Vemula et al., 2016)
Deteção de Antígeno	Testes rápidos de Antígeno	Detetam o antígeno nucleoproteína (NP) dos vírus <i>Influenza A</i> e <i>B</i> pela ligação aos anticorpos monoclonais no teste (Kumar & Henrickson, 2012).	15 minutos	<ul style="list-style-type: none"> - Foi usado na triagem de doentes com Influenza em 2009* - Sensibilidade entre 50%-70%* - Especificidade entre 90-95%* *(Kumar & Henrickson, 2012) - Detetam vírus <i>Influenza A</i> e <i>B</i> , mas não os distingue (World Health Organization, 2011)

Detecção de antigénio	Imunofluorescência direta aos anticorpos (DFA)	Deteta os antigénios presentes em células infetadas pelo vírus <i>Influenza</i> pela ligação dos anticorpos com fluorescência dos testes aos antigénios da amostra sendo posteriormente observados pela microscopia de fluorescência (Kumar & Henrickson, 2012).	1 a 4 horas	<ul style="list-style-type: none"> - Permite identificar várias etiologias infecciosas* - Usado no estudo epidemiológico de Saúde Pública* * (World Health Organization, 2011) - Detetam e diferenciam os vírus <i>Influenza</i> A e B (UptoDate, n.d.-a) 	
		Detetam a porção genética das proteínas HA, NA e M1 após a transcrição reversa do RNA viral para DNA por enzimas de transcrição reversa sendo depois amplificado e usado como <i>primer</i> (Bin Zhou, 2017)	1 – 8 horas	<ul style="list-style-type: none"> - Identifica várias etiologias infecciosas (DNA)* - Permite uma testagem em grande escala* *(Uyeki & Al., 2018) - Sensibilidade e Especificidade ≥90% (Maignan et al., 2019) - Deteta vírus <i>Influenza</i> A e B e distingue-os, como os subtipos do vírus <i>Influenza</i> A (UptoDate, n.d.-a) 	
Detecção de Anticorpo	Serológicos	Teste de inibição da Hemaglutinação (HAI)	Determina a presença de anticorpos contra a glicoproteína HA no soro do indivíduo ao ligar-se a hemácias de mamíferos ou aves (Vemula et al., 2016).	Deve ser feito 2 – 4 semanas após a infeção pelo vírus <i>Influenza</i> e colhido na fase de infeção aguda como na de convalescência	<ul style="list-style-type: none"> - Foi usado na avaliação da imunogenicidade da vacina em 2009* - Usado em contexto epidemiológico de Saúde Pública (da taxa global da <i>Influenza</i>) e estudos científicos* - Os testes HAI e EIA são preferências relativamente aos restantes testes serológicos* *(Vemula et al., 2016)(World Health Organization, 2011)(Kumar & Henrickson, 2012).
		Imunoteste enzimáticos (EIAs)	Usa os princípios do mecanismo de ELISA pela ligação do anticorpo presente do soro ao antigénio adicionado a poços numa placa de 96 poços pela reação enzimática e sucessivos processos de lavagem (Vemula et al., 2016).		
		Imunofixação do complemento	Identifica a componente complemento do soro do indivíduo pela ligação aos antigénios do teste (proteínas NP e M1) (Vemula et al., 2016).		

- As referências do tempo de detecção dos testes (UptoDate, n.d.-a)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020d).

Representação esquemática dos diferentes testes de diagnóstico da *Influenza* de acordo com a detecção antigénio, anticorpo e teste de cultura viral. As fontes dos dados são: (Kumar & Henrickson, 2012) (Bin Zhou, 2017) (Uyeki & Al., 2018) (World Health Organization, 2011) Vemula et al., 2016)

Os testes de diagnóstico usados na prática clínica são os RT-PCR dada a sensibilidade e especificidade serem > 90% como a rapidez do seu diagnóstico, o que permite otimizar a gestão terapêutica do doente (Maignan et al., 2019)(Kumar & Henrickson, 2012). São usados em doentes hospitalizados não só pelo benefício no diagnóstico da Influenza como permitem o diagnóstico diferencial de outros agentes patogênicos, permitindo assim otimizar a resposta no tratamento do doente hospitalar (Uyeki & Al., 2018)

O teste de cultura viral foi usado há vários anos no diagnóstico da Influenza, no entanto, por ser um teste cuja obtenção do diagnóstico é morosa não é habitualmente usado nos cuidados de saúde. É apenas utilizado caso haja a necessidade de confirmação de resultado de outro teste diagnóstico, como ocorre em casos de surtos epidêmicos cujo diagnóstico obtido adveio de testes rápidos de antígeno e testes de imunofluorescência direta (Kumar & Henrickson, 2012). Por sua vez, o uso de testes de cultura também serve na confirmação do diagnóstico caso haja persistência de sintomas da Influenza e resultados seriados positivos nos testes moleculares, como o RT-PCR (Uyeki & Al., 2018). Os testes rápidos de antígeno têm demonstrado ser úteis na triagem dos doentes não-hospitalizados para o diagnóstico de Influenza. Por sua vez, quando são usados, é necessário excluir o resultado com testes moleculares dada a tendência a falsos negativos e pela menor sensibilidade comparativamente aos testes moleculares (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Por isso, os testes rápidos de antígeno não são usados na orientação de decisão clínica. Porventura, podem ser usados em estudo de Saúde Pública como em surtos ocorridos em instituições (Uyeki & Al., 2018)(Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Os testes serológicos não são usados no diagnóstico de infeção pela Influenza mas sim usados em estudos de Saúde Pública como ocorreu na avaliação da imunogenicidade da vacina em 2009 com o uso do teste HAI (Vemula et al., 2016)(World Health Organization, 2011)(Kumar & Henrickson, 2012). O teste HAI continua ainda a ser usado na vigilância da taxa global da Influenza e na determinação de características do antígeno viral (Uyeki & Al., 2018)

IV.9. Tratamento

Por norma, o tratamento da Influenza é sintomático em doentes de baixo risco de severidade. Os doentes são aconselhados a regressar ao hospital caso, passadas 72 horas, a sintomatologia respiratória seja severa, como sinais de dificuldade respiratória. No entanto, doentes hospitalizados, indivíduos com sinais de infeção associado a dificuldade respiratória, idosos com comorbilidades que os predisponham para severidade de doença e grávidas ou puérperas são aconselhados a fazer terapêutica antiviral nas primeiras 48 horas após o início sintomatológico. (Černý, 2019). Os indivíduos com risco de desenvolvimento de doença severa estão demonstrados no quadro 2 do capítulo Epidemiologia.

O tratamento sintomático baseia-se na hidratação, administração de antipiréticos (como paracetamol e ibuprofeno intercalado), descanso e antitússicos caso a tosse cause desconforto torácico (como soluções derivadas de codeína) (UptoDate, n.d.-b). Caso o quadro clínico se agrave consideravelmente, os médicos devem também de suspeitar de co-infeção bacteriana e tratar empiricamente o doente por forma a melhorar o prognóstico e que os corticosteroides e imunoglobulinas devem ser evitados em pneumonia Influenza e na Síndrome de Doença Respiratória Aguda (Černý, 2019). O tratamento curativo abrange os antivirais disponíveis cujo intuito é a redução de severidade da Influenza e do número de dias de doença. Os antivirais usados na Influenza são Amantadina, Rimantadina, Peramivir, Zanamivir, Fosfato de Oseltamivir e Baloxavir Marboxil. Atualmente, a FDA aprovou o Peramivir, Zanamivir, Fosfato de Oseltamivir e Baloxavir Marboxil para administração (FDA, 2020).

A Amantadina e Rimantadina são os antivirais da Influenza mais antigos disponíveis no tratamento da Influenza. A Amantadina surgiu no mercado em 1966 após aprovação pela FDA para profilaxia no vírus *Influenza A*. Em 1994, a Rimantadina, derivado da Amantadina, é aprovada pela FDA no tratamento do vírus *Influenza A* (Centers for Disease Control and Prevention, 2019c). O mecanismo de ação das amantadinas atua no bloqueio da atividade do recetor M2 ao interferir no fluxo de hidrogénio, bloqueando a entrada viral nas células do hospedeiro (Erlikh, Abraham, & Kondamudi, 2010). Os fármacos foram amplamente usados e com eficácia calculada de 90% até à pandemia de 1980 onde se registaram os primeiros casos de resistência à Amantadina. A partir da

pandemia de 2005, estudos mostraram resistência às amantadinas em cerca de 91% na estirpe H3N2 e resistência à estirpe H1N1 pdm09 e H3N2 de 90% dos casos de ambas as estirpes em 2009 tendo, conseqüentemente, a FDA retirado as amantadinas como fármacos no tratamento curativo (Hussain, Galvin, Haw, Nutsford, & Husain, 2017)(FDA, 2020).

A Ribavarina atua na inibição da RNA polimerase viral. Inicialmente foi aprovada no tratamento do vírus respiratória sincicial e na hepatite C. (Jackson et al., 2000). Mais tarde, mostrou ser eficaz na redução da atividade da estirpe H7N9 emergente na China. Estudos laboratoriais realizados em ratos mostraram que a Ribavirina diminui o quadro até 10x comparativamente ao meio PBS (Bi et al., 2016). No entanto, não é um fármaco que é usado frequentemente no dia-a-dia pelo reduzido número de ensaios clínicos realizados e por só ter demonstrado benefício na combinação viral H7N9 (Bi et al., 2016). Os inibidores de Neuraminidase atuam no bloqueio da enzima viral neuraminidase, crucial na libertação dos viriões nas células hospedeiras. O Oseltamivir, Zanamivir e Peramivir fazem parte dos inibidores de neuraminidase tendo demonstrado eficácia reportada em cerca de 90% dos casos da estirpe H1N1 pdm09. O Oseltamivir reduziu em 0.55 dias de hospitalização em doentes não-risco e 0.74 dias em doentes de risco de Influenza severa (Jackson et al., 2000)(Gupta et al., 2015).

O Baloxavir Marboxil inibe a replicação viral ao ligar-se à subunidade PA do complexo polimerase viral. O tempo médio de melhoria de sintomas do Baloxavir Marboxil mostrou reduzir horas de sintomas comparativamente ao placebo em 0.75 dias e comparativamente ao oseltamvir de 0.5 dias (O'Hanlon & Shaw, 2019). A CDC aconselha o uso de Baloxavir Marboxil em doentes com doença Influenza ligeira, limitando o uso em grávidas ou pessoas com comprometimento do seu Sistema imunitário. No entanto, exclui o seu uso em doença severa pela ausência de dados que suportem a sua administração nestes doentes. A exclusão de grupos de pessoas prende-se ao facto de haver reduzida evidência clínica face ao benefício do fármaco (Centers for Disease Control and Prevention, 2021d).

Porventura, surgiu uma revisão feita pela *Cochrane* que apontou que a empresa farmacêutica *Roche* não documentou efeitos adversos do Oseltamivir, como alteração neuropsiquiátrica nos doentes Influenza que tomavam a terapêutica, e apontaram a reduzida evidência clínica de que o Tamiflu®, o nome comercial do Oseltamivir, reduzia

de facto a severidade e o número de dias de doença comparativamente ao grupo placebo (Jefferson et al., 2014). Neste contexto, a FDA interveio e afirmou que os dados do estudo *Cochrane* eram falaciosos e que iriam deixar o Tamiflu® disponível no mercado (Gupta et al., 2015). A orientação das *guidelines* americanas, europeias e portuguesas aconselham no tratamento da infeção ligeira a severa da Influenza o uso de Oseltamivir nas primeiras 48 horas em doentes com risco considerável de severidade. A quimioprofilaxia é aconselhada com o Oseltamivir ou Zanamivir a ser feita por 7 dias em doentes de alto risco para infeção Influenza, como em comunidades com ondas epidémicas, grávidas, crianças e idosos com mais de 65 anos (Direção-Geral da Saúde, 2015)(European Centre for Disease Prevention and Control, n.d.-a)(Centers for Disease Control and Prevention, 2021c). No entanto, estudos observacionais têm demonstrado o Oseltamivir e Zanamivir reduzem apenas em 0.5 dia de doença, questiona-se o uso contínuo do fármaco na atividade clínica, tendo apenas a OMS deixado de considerar o Tamiflu® como terapêutica essencial para terapêutica acessória (Kmietowicz, 2017). Visto que o tratamento curativo tem demonstrado em menos de 1 dia a sintomatologia do doente, a forma que tem demonstrado contornar a problemática de tendência da severidade nos grupos de risco prende-se na prevenção da Influenza, estando dependente das medidas de Saúde Pública e no esquema de vacinação anual disponível (Centers for Disease Control and Prevention, 2020j).

V. Vacinologia

O início da história das vacinas remonta o ano 1000 EC (Era Comum) numa comunidade de médicos chineses onde se praticava variolação, que é definida como a inoculação de pessoas pela inalação de partículas de pústulas de varíola de um doente para proteger outros indivíduos de doença (Thein, Goh, & Phua, 1988). A variolação chegou apenas à Europa no século XVIII após a chegada de imigrantes de Istambul que partilharam o seu conhecimento do método (Riedel, 2005). Por sua vez, a variolação chegou a Inglaterra em 1717 após a visita a Istambul da mulher do embaixador britânico da Constantinopla, chamada Lady Montague, que observou as comunidades turcas a praticarem a técnica de variolação. Posteriormente, em 1718, a Lady Montague quis que o seu filho de 5 anos fosse inoculado e, em 1721, o seu outro filho de 4 anos foi inoculado em frente a um

tribunal da realeza, o que permitiu que a palavra se espalhasse rapidamente na sociedade e a sua implementação em diversos países (Riedel, 2005).

O médico Edward Jenner e o agricultor Benjamin Jesty ficaram interessados nos contos partilhados em Inglaterra relativamente a leiteiras estarem protegidas da varíola por terem sido expostas previamente a *cowpox* do seu gado (Riedel, 2005). Benjamin Jesty iniciou os seus estudos ao ter inoculado a sua própria família e Edward Jenner inoculou diversas pessoas, tendo abrangido centenas de indivíduos locais e extrapolado conclusões e, em 1798, Jenner atribuiu o nome de variação a “vacinação da varíola” após a publicação de um livro relativo ao seu trabalho na área (Riedel, 2005)(Plotkin & Plotkin, 2011).

No século XIX, Louis Pasteur associou a doença infecciosa a um microorganismo e descobriu acidentalmente que a cólera de galinha, conhecida por *Pasteurella multocida*, poderia ser atenuada caso fosse exposta a alterações do meio, como altas temperaturas, oxigénio e produtos químicos (History of vaccines, n.d.) (Plotkin & Plotkin, 2011). Posteriormente, o estudo das vacinas com cólera atenuada foi abrangido para a vacina de bacilos Antrax atenuado tendo-se concluído que é possível proteger os animais vacinados de doença de cólera (Institute, 2017). Os contributos de Pasteur no vírus da raiva surgiram posteriormente, tendo sido a vacina com o vírus da raiva atenuado sido estudado em macacos, coelhos, caninos e, mais tarde, ter feito o primeiro estudo em humanos (Institute, 2017).

Paralelamente aos estudos de Pasteur, a vacina da varíola foi administrada em massas, tendo-se observado uma queda de casos de varíola (Riedel, 2005). Porventura, em 1893, ocorreram surtos epidémicos da varíola no estado de Indiana nos EUA instigados pela baixa taxa de adesão à vacina da varíola. Mais tarde, em 1947, a vacina da varíola foi massivamente administrada, permitindo uma redução drástica da incidência da doença. Assim, corroborou-se a correlação da taxa de vacinação com a diminuição dos casos de doença (History of vaccines, n.d.).

Em 1972 ocorreu um novo pico de casos de varíola tendo-se administrado a vacina de acordo com as cadeias de transmissão (anel de vacinação) o que permitiu uma queda abrupta de casos no mundo e, em 1980, a varíola foi declarada como doença infecciosa erradicada (History of vaccines, n.d.) (History of vaccines, 2014).

Efetivamente, a vacinologia surge com o princípio inicial na eliminação de doença ao treinar o sistema imunitário dos hospedeiros a combater o microorganismo. Por sua vez, as vacinas aliadas a medidas adequadas de vacinação permitem controlar os casos de doença e, possivelmente, a erradicação de doenças infecciosas. De notar que o potencial de erradicação de uma doença infecciosa surge caso o microorganismo etiológico seja transmitido de pessoa-a-pessoa, haja uma colaboração mundial no programa da vacinação e ocorra administração de vacina em anel de vacinação (History of vaccines, n.d.)(History of vaccines, 2014) (Dowdle, 1998).

Atualmente, o desenvolvimento das vacinas segue um modelo moroso que abrange as seguintes fases: fase pré-clínica, fase I, fase II, fase III e fase IV por forma a objetivar a relação da segurança da vacina como a sua eficácia e efetividade.

A figura 9 esquematiza as diferentes fases necessárias para o desenvolvimento de uma vacina.

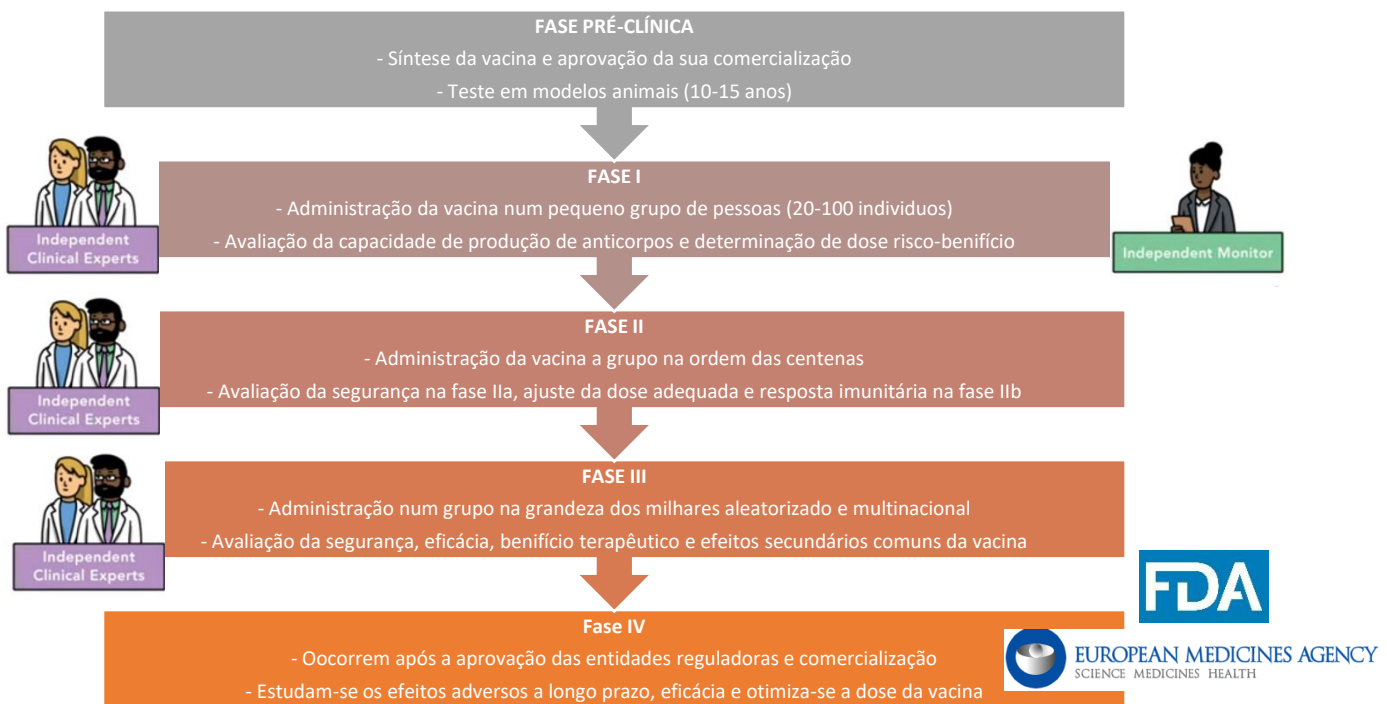


Figura 9: Processo de produção da vacina segundo o modelo dos ensaios clínicos - Representação das diferentes fases da produção da vacina aliada à aprovação das entidades reguladoras no processo. A produção da vacina pode demorar entre 10 a 15 anos na produção. No entanto, durante a pandemia da COVID-19 os ensaios pré-clínicos e clínicos ocorreram em simultâneo permitindo um encurtamento do tempo necessário dos ensaios clínicos. Fonte de imagens/informação: (WHO, 2020) (Luz, 2016) (Centers for Disease Control and Prevention, 2018b) (History of vaccines, 2021).

V.1. Aplicabilidade do plano de vacinação atual

As atuais vacinas da Influenza são administradas anualmente em meados de Setembro e Outubro no Hemisfério Norte por forma a que haja a produção de anticorpos otimizada na época endémica da Influenza (Direção Geral da Saúde, 2020). O intuito da implementação do plano de vacinação é permitir uma redução de hospitalizações e mortes pela Influenza (Centers for Disease Control and Prevention, 2021g). De modo que, a administração da vacina da gripe é feita em vários países sendo que o alvo populacional do plano da vacinação varia entre a Europa e os EUA. No quadro 5 estão representados os grupos de risco abrangidos no plano de vacinação da Influenza em Portugal, na Europa e nos EUA.

Quadro 5: Representação esquemática dos grupos considerados na vacinação da Influenza em Portugal, Europa e nos EUA

Grupos de risco abrangidos nos planos de vacinação da Influenza

Portugal	Europa	Estados Unidos da América
<u>Idosos com mais de 65 anos</u>	<u>Idosos com mais de 65 anos</u>	<u>Idosos com mais de 50 anos</u>
<u>Crianças com mais de 6 meses caso se acompanhem com comorbilidades ou residentes em estruturas residências</u>	<u>Crianças com mais de 6 meses caso se acompanhem com comorbilidades ou residentes em estruturas residências</u>	<u>Crianças entre 6 meses e 5 anos saudáveis e com comorbilidades</u>
Comorbilidades como:	Comorbilidades como:	Comorbilidades como:
<ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar crónica (Doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose quística ou bronquite crónica) e Asma Doenças neurológicas e do neurodesenvolvimento Doenças hematológicas Doenças endócrinas e metabólicas <u>Obesidade com IMC > 30 kg/m²</u> Doença cardiovascular Doença renal Doença hepática Comprometimento do sistema imunitário como infeção pelo vírus da Imunodeficiência humana, neoplasias e asplenia ou medicação como 	<ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar crónica (Doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose quística ou bronquite crónica) e Asma Doenças neurológicas e do neurodesenvolvimento Doenças hematológicas Doenças endócrinas e metabólicas <u>Obesidade com IMC > 40 kg/m²</u> Doença cardiovascular Doença renal Doença hepática Comprometimento do sistema imunitário como infeção pelo vírus da Imunodeficiência humana, neoplasias ou medicação como Quimioterapia e Radioterapia 	<ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar crónica (Doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose quística ou bronquite crónica) e Asma Doenças neurológicas e do neurodesenvolvimento Doenças hematológicas Doenças endócrinas e metabólicas <u>Obesidade com IMC > 40 kg/m²</u> Doença cardiovascular Doença renal Doença hepática Comprometimento do sistema imunitário como infeção pelo vírus da Imunodeficiência humana, neoplasias ou medicação como Quimioterapia e Radioterapia

- | | | | |
|---|---|------------------------|---|
| Quimioterapia | e | • Alterações genéticas | • Alterações genéticas |
| Radioterapia | | | • <u>Jovens com < 19 anos sob acido acetilsalicílico</u> |
| • Transplantação | | | • <u>Antecedentes de AVC</u> |
| • Alterações genéticas | | | |
| • <u>Jovens com < 19 anos sob acido acetilsalicílico</u> | | | |

Grávidas e pós-parto (até 2 semanas após parto)	Grávidas e pós-parto (até 2 semanas após parto)	Grávidas e pós-parto (até 2 semanas após parto)
Institucionalizados	Institucionalizados	Institucionalizados
Profissionais de saúde	Profissionais de saúde	Profissionais de saúde

Encontra-se sublinhado as diferenças no plano de vacinação entre Portugal, Europa e nos EUA. Fonte de dados: (Direção Geral da Saúde, 2020)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020f)(European Centre for Disease Prevention and Control, 2012)

Relativamente às diferenças dos planos de vacinação, tanto a DGS como a ECDC aconselham a administração da vacina em crianças com mais de 6 meses com comorbilidades ao passo que a CDC aconselha a administração universal da vacina a crianças com mais de 6 meses, independentemente do seu estado de saúde habitual (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012)(Direção Geral da Saúde, 2020)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020f).

A importância da administração da vacina nos indivíduos com comorbilidades é enfatizada tanto na Europa como nos EUA dada a vulnerabilidade do seu sistema imunitário na resposta à infeção natural pelo vírus *Influenza* (Lawrence, 2004). A obesidade é fator para vacinação por ter sido demonstrado em estudos recentes que a obesidade vulnerabiliza os indivíduos a desenvolver doença severa pela Influenza até 2 vezes mais comparativamente aos indivíduos saudáveis (Lawrence, 2004). As grávidas são aconselhadas a tomar a vacina da Influenza pelo: 1. potencial de transmissão de imunidade passiva pela placenta ao feto; 2. alterações fisiológicas inerentes do sistema imunitário da mãe que possibilitam a viabilidade da gravidez ao não reconhecer o feto como corpo estranho; 3. ocorrem adaptações na mucosa uterina para evitar o recrutamento de resposta imunitária local (Mor & Cardenas, 2010).

V.2. Vacinas da Influenza disponíveis na Europa

As vacinas permitem mimetizar os mecanismos naturais da infeção pelo vírus *Influenza* e, conseqüentemente, induzir a ativação do sistema imunitário por forma a que haja produção de anticorpos neutralizadores que permitem proteger o indivíduo da

Influenza. Por sua vez, a resposta imune do indivíduo depende de diversos fatores correlacionando-se com os polimorfismos genéticos inerentes na população, do estado de imunidade basal tais como a idade e de comorbilidades (referidas no quadro 5 do capítulo Vacinologia) (Bahadoran et al., 2016).

Os tipos de vacinas da Influenza atualmente disponíveis são as vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas e vacinas recombinantes. Por sua vez, as vacinas inativadas são as mais usadas, sendo que as quadrivalentes são preferenciais (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b). Atualmente, o método de produção das vacinas da Influenza depende de meio de ovos, mantendo-se fiéis à forma idealizada em 1940 de produção da vacina (Centers for Disease Control and Prevention, 2019a).

❖ **Vacinas vivas atenuadas**

As vacinas vivas atenuadas produzem-se pela inserção em meios de ovos frios do vírus *Influenza* circulante atenuado, sendo manipulado em laboratório por forma a constituir as combinações genéticas HA/NA pretendidas secundários (Centers for Disease Control and Prevention, 2021e). A temperatura baixa dos meios de ovo na produção deve-se pela suscetibilidade demonstrada que altas temperaturas cursam com alterações do vírus atenuado e, conseqüentemente, influencia a eficácia da vacina (Greenberg & Kemble, 2008).

A formulação da vacina viva atenuada é intranasal permite que ocorra uma resposta imune mais aproximada à infecção natural, permitindo mimetizar a infecção natural ao despoletar a resposta a libertação da Imunoglobulina A (IgA) na mucosa nasal e posteriormente desencadear a ativação da resposta das células T e das células B ocorrendo a libertação da Imunoglobulina M (IgM), Imunoglobulina G (IgG) e IgA (Mohn, Smith, Sjursen, & Cox, 2018). Visto que a vacina viva atenuada permite mimetizar a infecção pelo vírus Influenza pode cursar com efeitos adversos tais como cefaleia, congestão nasal, tosse, mialgias, febre, vômitos, anorexia, irritabilidade e/ou odinofagia (Centers for Disease Control and Prevention, 2021e) (Mohn et al., 2018).

As vacinas vivas atenuadas estão aconselhadas a crianças ou a pessoas de baixo risco de severidade de doença da Influenza, sendo que estudos evidenciaram que crianças com

menos de 5 anos e mais de 6 meses tiveram uma redução considerável de 70-93% de doença severa (Centers for Disease Control and Prevention, 2021e)(FDA, n.d.-d).

As crianças com menos de 2 anos de idade, grávidas e pessoas com comorbilidades devem ser excluídas da administração das vacinas vivas atenuadas por constituírem vulnerabilidade de severidade de quadro clínico (FDA, n.d.-d)(Centers for Disease Control and Prevention, 2021e)(Yamayoshi & Kawaoka, 2019). Para além disso, as crianças com asma devem ser excluídas das vacinas vivas atenuadas visto que podem cursar com hospitalizações de descompensação da asma e serem aconselhadas as vacinas atenuadas (Belshe et al., 2007) (FDA, n.d.-d).

❖ Vacinas inativadas

Este grupo é constituído por vacinas inativadas, vacinas inativadas com adjuvante, vacinas inativadas com alta dose e vacinas em meio de células de mamífero

→ **Vacina inativada**

Cerca de 85% das vacinas derivam de vacinas inativadas baseadas em meio de ovos, sendo que cerca de 15% das vacinas inativadas são produzidas em meio de células e vacinas recombinantes. As vacinas inativadas podem ser trivalentes ou quadrivalente, de acordo com o número de variantes da Influenza. Habitualmente, as trivalentes possuem duas variantes do vírus *Influenza A* e uma variante do vírus Influenza B, ao passo que, as quadrivalentes têm duas variantes tanto do vírus *Influenza A* como do vírus *Influenza B* (Yamayoshi & Kawaoka, 2019).

A constituição das vacinas inativadas pode ter o virião completo inativo ou morto, partes ou subunidades do virião. O virião completo é inativado com formaldeído ou β -propiolactona e tem demonstrado induzir a resposta imune mais fiel à infeção natural pelo vírus *Influenza* (Sabbaghi, Miri, Keshavarz, Zargar, & Ghaemi, 2019). A obtenção das partes ou subunidades do virião ocorre pela desintegração viral ao adicionar-se detergente ou éter-dietílico ou radiação (Sabbaghi et al., 2019). Posteriormente, manipulam-se os meios para a inserção da combinação HA/NA nos ovos de galinha, massifica-se o processo para a produção da vacina e purificam-se os vírus (Yamayoshi & Kawaoka, 2019).

A formulação das vacinas inativadas são administradas por via intramuscular ou subcutânea. Tradicionalmente, administra-se intramuscularmente, sendo que as células dendríticas do local da vacinação permitem recrutar os antígenos para os gânglios linfáticos da axila como locais (exemplo as amígdalas). Serologicamente, ocorre a produção máxima de anticorpos 2 - 3 semanas após a vacinação cursando com um pico de IgG, ao passo que a IgA é também produzida como a IgM mas em menor escala (R. J. Cox, Brokstad, & Ogra, 2004).

Quanto aos efeitos secundários comuns pode ocorrer tumefação no braço, febre, mialgias e cefaleias. As crianças tenham história pregressa de epilepsia estão contraindicadas a tomar a vacina inativada da Influenza juntamente com as vacinas pneumocócica ou da vacina conjugada da difteria, tétano e poliomielite pelo risco associada superior de eventos epiléticos (FDA, n.d.-e) (Centers for Disease Control and Prevention, 2019b).

→ **Vacina inativada associada a adjuvante**

As vacinas inativadas com adjuvante foi aprovada por forma a otimizar a resposta imune da vacina inativada em indivíduos com comprometimento do sistema imunitário como idosos com mais de 65 anos (Tregoning, Russell, & Kinnear, 2018).

A sua produção é dependente de ovos e associa-se o adjuvante emulsionante MF59/AS03/AF03 ou alumínio que permite a otimização do recrutamento da resposta imunitária para o local da injeção da vacina e uma resposta imunitária amplificada ao antígeno e da resposta de memória (Centers for Disease Control and Prevention, 2021a).

A vacina inativada com adjuvante permite salientar a visibilidade dos antígenos virais tanto às células do sistema imune inato, CDs e células do sistema imune celular e humoral. Consequentemente, permite otimizar a produção de anticorpos produzidos (Tregoning et al., 2018).

Para além de otimizar a resposta imunitária, o uso do adjuvante permite uma resposta imunitária cruzada e, por consequência, uma resposta da vacina para além das estirpes da vacina (Harding & Heaton, 2018).

Os efeitos adversos mais comuns documentados advém do seu efeito de aumentar a recrutação de células do sistema imunitário, tais como dor no local de injeção, mialgia, cefaleia e cansaço (FDA, n.d.-a).

→ **Alta dose de vacina inativada**

A vacina de alta dose foi aprovada para administração em idosos com mais de 65 anos e pessoas com comprometimento do sistema imunitário por forma amplificar a resposta imune à vacina inativada convencional (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b). A vacina de alta dose é preparada em ovos de galinha sendo que o vírus Influenza é inativado, purificado e desfeito quimicamente tornando-se em subunidade de antigénios HA sendo posteriormente amplificado, purificado e usado posteriormente nas vacinas com maior concentração de antigénio comparativamente à vacina tradicional inativada (Interactions, In, & Populations, 2010) (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b).

Os efeitos adversos comuns são dor local da injeção, mialgia, febre e mal estar geral (Pasteur, n.d.).

O mecanismo de produção das vacinas referidas anteriormente é dependente de meios de ovos, sendo que o seu uso é perpetuado pela:

1. Elevada produção anual de doses, aproximadamente 1.5 bilhões de doses, que outras técnicas carecem na compatibilidade de produção (Harding & Heaton, 2018)(Krietsch Boerner, 2020);
2. Ser o meio mais barato dada a elevada capacidade de produção e crescimento viral (Harding & Heaton, 2018) (Krietsch Boerner, 2020);
3. Por serem as mais baratas permitem o acesso à vacina a um maior número de países; (Harding & Heaton, 2018) (Krietsch Boerner, 2020);

Porventura, a vulnerabilidade da vacina prende-se pela:

1. Dependência constante do ajuste às variantes das combinações HA/NA circulantes, a presença de variantes fastidiosas no meio de ovo (como o vírus *Influenza A H3N2*) (Harding & Heaton, 2018) (Krietsch Boerner, 2020);
2. Predisposição a mutações da porção superior da proteína HA durante a produção nos meios de ovo (Harding & Heaton, 2018) (Krietsch Boerner, 2020);

3. Reduzida capacidade de monitorização durante a produção (Harding & Heaton, 2018) (Krietsch Boerner, 2020);

As vacinas produzidas em vacinas inativadas cuja maioria tinha adjuvante têm demonstrado ter uma efetividade entre 60%-93% (cuja mediana é de 69%) na prevenção de idas ao hospital em indivíduos com menos de 65 anos (Osterholm, Kelley, Sommer, & Belongia, 2012). Em idosos com mais de 65 anos mostrou uma redução da mortalidade em 4,6% e uma redução de 8.5% de hospitalizações por pneumonia e Influenza (Osterholm et al., 2012). No entanto, estes dados divergem relativamente à real importância no decurso da Influenza pela existência de estudos prévios que referem valores superiores na redução tanto das hospitalizações como da mortalidade. De acordo com a CDC a média da efetividade da vacina da Influenza na redução de casos severos da Influenza entre 2005 – 2020 variou entre os 19% – 60% (cuja mediana de 47%)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020a).

Um estudo recente evidenciou que a vacina viva atenuada mostrou ser mais eficaz comparativamente à vacina inativada caso o sistema imunitário do indivíduo seja *naïve* ao vírus *Influenza* (Krishnan et al., 2021). No entanto, as vacinas inativada e viva atenuada têm a mesma eficácia após a segunda exposição ao vírus *Influenza* (Krishnan et al., 2021).

As restantes vacinas podem ser administradas a qualquer indivíduo. Salientando-se que pessoas com alergia a ovo devem optar por outras vacinas, como as vacinas recombinantes por forma a reduzir os efeitos secundários (Centers for Disease Control and Prevention, 2021e)

❖ Vacinas inativadas

→ **Vacinas em meio de células de mamífero**

São vacinas produzidas em meio de células de mamífero. O vírus *Influenza* é inserido em tecidos celulares num sistema de células renais de canino (MCDK) ou em células epiteliais renais de macaco de Africa (*Vero-Cells*) ficando a crescer até 3 dias e, posteriormente, é centrifugado e o sobrenadante com partes de vírus *Influenza* é usado

no substrato da vacina após serem amplificados, purificados e inativados para o uso na vacina (Rubio & Eiros, 2018).

O modo de administração é intramuscular e como efeitos adversos comuns ocorre eritema do local da injeção, cefaleia, mialgia e mal-estar geral (FDA, n.d.-c).

As vantagens deste meio são:

1. Permitem a obtenção de grandes quantidades de substrato para a produção da vacina, ao invés das vacinas dependentes de ovos (Rubio & Eiros, 2018)(Bühler & Ramharter, 2019);
2. O tempo de produção é apenas dependente dos biorreatores e, com maior investimento permitirá maior rentabilidade (Bühler & Ramharter, 2019);
3. A produção em células de mamíferos, em contraste com as células aviárias, permite extrair uma expressão antigénica mais aproximada ao antigénio real circulante do hospedeiro por ser tratada em condições controladas (Rubio & Eiros, 2018) (Bühler & Ramharter, 2019);
4. Permite incluir pessoas na vacinação alérgicas às proteínas do ovo (Bühler & Ramharter, 2019);
5. Por último, a redução de mutações que a glicoproteína HA sofre comparativamente ao meio de ovos. Estudos reportaram que as vacinas em meio células constituídas com a variante H3N2 mostraram ter melhor compatibilidade comparativamente às células produzidas em meio de ovo (Rubio & Eiros, 2018) (Bühler & Ramharter, 2019);

No entanto:

1. O meio de células é fragilizado pela suscetibilidade de mutação das glicoproteínas HA/NA demonstrada aquando da transferência entre células no meio MCDK (Y. N. Lamb, 2019) (Bühler & Ramharter, 2019);
2. Reduzido investimento que vulnerabiliza o estudo da vacina, como o real tempo de produção necessário e a custo-eficácia (Bühler & Ramharter, 2019);

A vacina produzida em meio de células de mamífero tem benefícios comparativamente às vacinas inativadas como demonstrou ter uma abrangência alargada ao vírus *Influenza B*, constituindo potencial para a produção de vacinas otimizadas (Y. N. Lamb, 2019).

❖ Vacina Recombinante

→ **Vetor viral (baculovírus)**

Este método usa o segmento do RNA viral da glicoproteína HA que é transferido para um vetor de baculovirus por RT-PCR ou pela síntese genética dos antígenos virais em laboratório a partir de porções genômicas conhecidas (Harding & Heaton, 2018). De seguida, o gene clonado HA é integrado no genoma DNA do baculovírus sendo transferidos para células de insetos. Subsequentemente, há a produção de *stock viruses* em biorreatores por forma a produzir a proteína recombinada HA que depois é purificada e usada na vacinação (M. M. J. Cox & Hollister, 2009) (Harding & Heaton, 2018).

O modo de administração é por via intramuscular ou oral cursando com os seguintes efeitos adversos como dor no local da injeção, febre, mialgias, artralgias, cefaleia e fadiga. O seu uso deve ser limitado a crianças com menos de 3 anos, grávidas e em lactação pela lacuna de evidência face às potenciais reações adversas à vacina (FDA, n.d.-b).

As vantagens deste método são:

1. É uma estratégia que não é dependente da seleção dos vírus *Influenza* e que permite uma atualização flexível às alterações das estirpes virais (M. M. J. Cox & Hollister, 2009)(He, Madhan, & Kwang, 2009).
2. Independente das complicações da produção de ovos e permite uma produção custo-eficaz de vacinas fiéis aos antígenos, com maior concentração de HA e baixos níveis de contaminação (M. M. J. Cox & Hollister, 2009) (He et al., 2009).
3. Permite incluir indivíduos com alergia a proteínas de ovo (M. M. J. Cox & Hollister, 2009) (He et al., 2009).

No entanto:

1. Custo elevado em comparação às vacinas produzidas em meios de ovos (He et al., 2009)
2. Vacina com a menor capacidade de preservação (um tempo limite de 9 meses) (He et al., 2009)

3. Baixo investimento nesta técnica que impossibilita a sua competição com o método atual impedem a sua alta produção e posterior baixo custo (M. M. J. Cox & Hollister, 2009) (He et al., 2009).

A eficácia da vacina Flublok® demonstrou ser superior à das vacinas inativadas, no entanto, a verdadeira eficácia e efetividade da vacina são desconhecidas dado o reduzido número de ensaios clínicos realizados comparativamente às vacinas atuais (M. M. J. Cox, Izikson, Post, & Dunkle, 2015).

V.3. Imunogenicidade das atuais vacinas da Influenza

De uma forma geral, a imunogenicidade das vacinas ao vírus *Influenza A* dura um período médio de 4 meses, sendo que o pico de imunidade ocorre ao primeiro mês cuja quantidade de anticorpos neutralizadores decresce ao longo do tempo (Skowronski et al., 2008). Por sua vez, a época epidémica dura cerca de 6 meses tornando um desafio a decisão de quando é que se deve administrar a vacina por forma a otimizar a cobertura da vacina (Fonville et al., 2015).

Estudos realizados relativamente à quantidade de anticorpos em idosos comparativamente aos jovens mantem-se uma incógnita visto que se contradizem, como alguns que afirmam que os jovens produzem maior quantidade de anticorpos, medidos pelo método HAI, comparativamente aos idosos ou vice-versa (Skowronski et al., 2008). No entanto, o que parece prevalecer é que a quantidade de anticorpos entre idosos e jovens é idêntica, permitindo uma proteção de doença severa semelhante (Skowronski et al., 2008). Para além disso, estudos têm mostrado que indivíduos que tenham uma maior quantidade de anticorpos pré-vacina têm apenas maior facilidade na produção de anticorpos, mas não quanto à quantidade de anticorpos produzidos. Por sua vez, os indivíduos com reduzida quantidade de anticorpos mostraram também proteção de quadro de Influenza severa (Skowronski et al., 2008).

Dado que o alvo das vacinas atuais depende das porções mutáveis das glicoproteínas, pode ter um foco diferente ao da variante circulante e não conferir proteção ao indivíduo de desenvolver quadro de Influenza da época epidémica em questão. Por sua

vez, estudos têm demonstrado conferir uma imunidade de base até 1 ano após a vacina para quando a variante presente na vacina circule (Fonville et al., 2015). Por forma a ter uma cobertura da vacina otimizada, todos os anos a vacina é administrada aos indivíduos propostos no plano de vacinação. Porventura, desconhece-se se há interferência da vacinação repetida na otimização da resposta imune à vacina, havendo estudos que declaram que possa contribuir para o detrimento da resposta imune induzida (Cheng et al., 2017)(Khurana et al., 2019).

V.4. Fragilidades das vacinas atuais da Influenza

Embora a vacina da Influenza reduza a taxa de incidência de casos severos, as vacinas têm o seu “calcanhar de Aquiles”, interferindo na otimização do potencial de imunogenicidade.

O principal obstáculo à otimização da eficácia da vacina é o seu alvo ser a porção superior das glicoproteínas HA e NA uma vez que constituem segmentos virais onde ocorrem mutações. O alvo das vacinas é porção globular HA e NA dado serem os principais indutores de resposta imune (Bahadoran et al., 2016)(Steinhauer, 1999)(Hale et al., 2010) (Khurana et al., 2019)(Wong & Webby, 2013).

Em adição, o mecanismo principal de produção das vacinas atuais é dependente de meios de ovos que, por si, são um fator indutor de mutação das glicoproteínas HA/NA visto que exercem pressão genética pela epigenética diferente ao do ser humano e, assim, permite a mudança da constituição genética viral inicial (Harding & Heaton, 2018).

O método convencional das vacinas depende também da quantidade e da qualidade de ovos disponíveis e, caso haja reserva de ovos com defeito, os ovos são rejeitados reduzindo-se a quantidade disponível para a produção de vacina e, por consequência, um menor número de indivíduos têm acesso à vacina (Harding & Heaton, 2018) (Khurana et al., 2019)(Wong & Webby, 2013).

A produção atual de vacinas é um processo moroso e, caso haja a deteção de combinações diferentes às previstas de HA/NA próximo da época epidémica pelas entidades reguladoras, há uma limitação na integração da variante do vírus *Influenza* na vacina e, assim, o alvo da vacina é divergente das variantes circulantes, tornando a

produção de anticorpos dirigidos ineficaz (Yamayoshi & Kawaoka, 2019)(Harding & Heaton, 2018) (Fonville et al., 2015)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020g). Por outro lado, a vacina induz uma imunidade por curtos períodos de tempo, cuja duração média é de 4 meses sendo que decresce a partir do primeiro mês, vulnerabilizando o indivíduo a doença severa (Fonville et al., 2015) (Skowronski et al., 2008) (Khurana et al., 2019)(Wong & Webby, 2013).

Dadas as informações prévias, as vacinas da Influenza atuais têm demonstrado ter uma efetividade limitada (com valores médios de efetividade que variam entre 19% – 60% (cuja mediana é de 47%) (Centers for Disease Control and Prevention, 2020a)(Skowronski et al., 2008). Por forma ultrapassar a vulnerabilidade das pessoas a desenvolver doença moderada a severa, as vacinas são administradas anualmente. No entanto, de acordo com alguns estudos, a administração da vacina anualmente pode ser detrimental na otimização da produção de anticorpos do indivíduo (Cheng et al., 2017) (Khurana et al., 2019).

Por último, o controlo epidémico das doenças infecciosas depende de um plano de vacinação universal capaz de chegar a qualquer indivíduo no mundo. No entanto, existem disparidades na distribuição das vacinas mundialmente, em particular em países de baixo PIB (produto interno bruto) per capita, contribuindo para a ineficácia do esquema de vacinação atual (Khurana et al., 2019)(Wong & Webby, 2013)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020h).

Por tudo isto, novas vacinas têm sido criadas por forma a ultrapassar as fragilidades das vacinas atuais que permitam uma produção rápida, com eficácia e efetividade otimizadas, indução de imunidade prolongada, ser independente das mutações das porções superiores das glicoproteínas HA e NA como de fatores externos durante a produção da vacina. Neste sentido, várias entidades têm criado alternativas tanto no método de produção como alvos das vacinas.

V.5. Propostas de novas vacinas da Influenza

A idealização de novas vacinas surge por forma a ultrapassar as fragilidades das vacinas atualmente disponíveis e, assim, permitir otimizar a resposta imunitária do indivíduo. Neste contexto, várias vacinas têm surgido cujo alvo são porções imutáveis do vírus

Influenza ou mecanismos de produção mais rápidos, flexíveis à atualização de novas variantes e que permitam um acesso à vacina mais abrangente.

Uma vacina eficaz é definida pela capacidade de redução de casos da doença ou redução do quadro de doença severa comparando o grupo vacinado com o grupo não-vacinado em condições ideais e em estudos randomizados. No entanto, a efetividade da vacina é definida pela capacidade da vacina na proteção imunitária em condições reais na comunidade por estudos observacionais (Orenstein et al., 1985)(Centers for Disease Control and Prevention, 2016). Uma vacina ideal é definida pela elevada segurança, eficácia, custo-efetividade, facilidade de administração, estabilidade térmica e poder ser administrada em combinação com outros agentes (como vacinas conjugadas) e induzir imunidade prolongada (Bharatbiotech, 2020).

Assim, surgem alternativas com intuito de encontrar os critérios desejados, sendo as alternativas: a genética reversa, manipulação de baculovírus, uso de vetores, vacina de RNA e DNA, indutores de resposta de células T citotóxicas e vacina cujo foco são proteínas estáveis na estrutura do vírus Influenza. No quadro 6 estão representados os mecanismos de produção das diferentes vacinas recentemente desenvolvidas como as valências e fragilidades dessas vacinas.

Quadro 6: Novas vacinas disponíveis da Influenza – representação do mecanismo da vacina, valências comparativamente às vacinas atuais e as suas fragilidades.

	Mecanismo	Valências comparativamente às vacinas atuais	Fragilidades da vacina
<p>Novas Vacinas disponíveis</p> <p>Genética Reversa</p>	<p>Usa os princípios da engenharia da genética reversa. Inicialmente, o vírus replica-se em meio de ovo. De seguida, os 8 genes presentes no RNA do vírus <i>Influenza</i> são inseridos num plasmídeo (segmento circular de DNA criado por RT-PCR). Por sua vez, os genes HA e NA são selecionados diretamente das estirpes que circulam no momento e inseridos nos plasmídeos. Posteriormente, são transferidos para células de mamífero aprovadas pela FDA para a sua amplificação. Mais tarde, os vírus são preparados e purificados para a vacina (Nogales & Martínez-Sobrido, 2017)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>X Produção de maior quantidade de vacinas num menor período de tempo.</p> <p>X Facilidade de atualização das combinações de HA/NA de acordo com as recentes variantes circulantes.</p> <p>X Acesso a um conhecimento pormenorizado do vírus.</p> <p>X Exploração de outros alvos no sistema imunitário da vacina da Influenza, como a proteína NS1 ser o foco da vacina (Nogales & Martínez-Sobrido, 2017)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>X A RNA polimerase do mecanismo de genética reversa tem maior afinidade para genoma humano ou de primata do que para os segmentos genéticos do vírus <i>Influenza</i>.</p> <p>X Processo dispendioso e escassos resultados de estudos (Nogales & Martínez-Sobrido, 2017) (Wong & Webby, 2013).</p>
<p>Virus-like Particles (VPLs)</p>	<p>As VPLs são nanopartículas sem informação genética constituído apenas pela capsíde externa com as proteínas HA, NA, M1 e, por vezes M2. O substrato das VPLs pode advir de baculovirus ou de células de insetos ou vegetais (Pushko & Tretyakova, 2020)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>X Estudos mostram indução de resposta humoral e celular, contrastando com as atuais vacinas inativadas que induzem apenas a resposta humoral.</p> <p>X Possibilidade de adicionar até 3 combinações de HA/NA diferentes na mesma VPL e atingir vários alvos na indução de resposta imunitária.</p> <p>X Versatilidade pela adição da porção “ stem” de HA e proteínas M2e e M2 e indução de diferentes alvos na resposta imune.</p> <p>X Produção de vacina custo-eficaz e acessível quanto à produção de substrato de vacina (Pushko & Tretyakova, 2020)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>X Estudos atuais apenas em modelos animais e em fase I de ensaios clínicos.</p> <p>X As proteínas do baculovirus podem interferir na indução da resposta imunitária pelo vírus <i>Influenza</i>.</p> <p>X Processos dispendiosos e com escassos resultados de estudos (Pushko & Tretyakova, 2020) (Wong & Webby, 2013).</p>

Representação esquemática das novas vacinas idealizadas de acordo com o seu mecanismo, valências comparativamente às vacinas atuais e fragilidades. Fonte dos dados (Pushko & Tretyakova, 2020) (Wong & Webby, 2013) (Nogales & Martínez-Sobrido, 2017)(Wong & Webby, 2013).

Quadro 6: Novas vacinas disponíveis da Influenza – representação do mecanismo da vacina, valências comparativamente às vacinas atuais e as suas fragilidades.

Novas Vacinas disponíveis	Mecanismo	Valências comparativamente às vacinas atuais	Fragilidades da vacina
<p>Vetor</p> <p>Adição de segmentos genéticos que expressam a glicoproteína HA noutros vírus que estão atenuados ou inativados como os Adenovirus, poxvirus, parainfluenza vírus ou alphavirus onde são removidos os fatores de virulência. Os adenovirus têm sido estudados como adjuvantes na otimização da resposta imune. As vacinas quando são administradas atuam na mucosa mimetizando a infeção natural sem cursar com sintomatologia. Estudos evidenciam que as vacinas adenovirus são capazes de induzir memória no sistema imune mesmo após a sua eliminação. Os poxvirus mostraram induzir resposta imune células T citotóxicas. A vacina foi testada em animais e humanos e em aves. No entanto, foi descontinuada pela falência de expectativas de resultados (Tang et al., 2009)(Vries & Rimmelzwaan, 2016)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>Adição de segmentos genéticos que expressam a glicoproteína HA noutros vírus que estão atenuados ou inativados como os Adenovirus, poxvirus, parainfluenza vírus ou alphavirus onde são removidos os fatores de virulência. Os adenovirus têm sido estudados como adjuvantes na otimização da resposta imune. As vacinas quando são administradas atuam na mucosa mimetizando a infeção natural sem cursar com sintomatologia. Estudos evidenciam que as vacinas adenovirus são capazes de induzir memória no sistema imune mesmo após a sua eliminação. Os poxvirus mostraram induzir resposta imune células T citotóxicas. A vacina foi testada em animais e humanos e em aves. No entanto, foi descontinuada pela falência de expectativas de resultados (Tang et al., 2009)(Vries & Rimmelzwaan, 2016)(Wong & Webby, 2013).</p>	<ul style="list-style-type: none"> X Resposta imune aproximada à resposta pela infeção natural pelo vírus <i>Influenza</i>. X Produção de vacina custo-eficaz num menor período de tempo. X Facilidade na manipulação viral e otimização da resposta imunitária. <p>(Tang et al., 2009)(Vries & Rimmelzwaan, 2016)(Wong & Webby, 2013)</p>	<ul style="list-style-type: none"> X Infeções prévias aos vetores podem interferir na indução de resposta imune. X Desconhecimento dos efeitos adversos da vacina no contexto da Influenza. X Escassos resultados no âmbito da Influenza de ensaios clínicos (Tang, Zhang, Toro, Shi, & Van Kampen, 2009)(Vries & Rimmelzwaan, 2016)(Wong & Webby, 2013)
<p>Vacinas de DNA ou RNA</p> <p>Usam-se plasmídeos e informação genética em plasmídeos de DNA em que as vacinas de RNA não necessitam de mecanismos de transcrição genética. De seguida são amplificados em bactérias, purificados e usados em vacinas. Capaz de induzir resposta pela apresentação de MHC I e MHC II estimulando resposta das células CD4+ e CD8+. Recentemente, adjuvantes têm sido usados para ultrapassar os obstáculos à indução de resposta imune. (Rockman et al., 2020)(Wong & Webby, 2013)</p>	<p>Usam-se plasmídeos e informação genética em plasmídeos de DNA em que as vacinas de RNA não necessitam de mecanismos de transcrição genética. De seguida são amplificados em bactérias, purificados e usados em vacinas. Capaz de induzir resposta pela apresentação de MHC I e MHC II estimulando resposta das células CD4+ e CD8+. Recentemente, adjuvantes têm sido usados para ultrapassar os obstáculos à indução de resposta imune. (Rockman et al., 2020)(Wong & Webby, 2013)</p>	<ul style="list-style-type: none"> X Alvo de imunidade amplo comparativamente às atuais. X Produção rápida e possibilidade de adicionar múltiplas variantes. X Facilidade de utilizar a maquinaria de replicação das células do hospedeiro pela similaridade genética. X Aplicabilidade em neoplasias e outras agentes patogénicos como o vírus Zika. <p>(Rockman et al., 2020)(Wong & Webby, 2013)(Meurens, 2020)</p>	<ul style="list-style-type: none"> X Desconhecimento no âmbito da Influenza por estudos serem reduzidos (Rockman, Laurie, Parkes, Wheatley, & Barr, 2020)(Wong & Webby, 2013)

Representação esquemática das novas vacinas idealizadas de acordo com o seu mecanismo, valências comparativamente às vacinas atuais e fragilidades. Fonte dos dados (Rockman et al., 2020)(Wong & Webby, 2013) (Tang et al., 2009)

Quadro 6: Novas vacinas disponíveis da Influenza – representação do mecanismo da vacina, valências comparativamente às vacinas atuais e as suas fragilidades.

Novas Vacinas disponíveis	Mecanismo	Valências comparativamente às vacinas atuais	Fragilidades da vacina
<p>Indutoras de células T citotóxicas</p>	<p>O alvo habitual das CTLs é a porção constante das glicoproteínas da superfície viral. Estas vacinas induzem uma resposta imune tardia na infecção natural pela Influenza para restringir a evolução da doença. Assim, as vacinas CTLs tem como objetivo criar im unidade de base para o aparecimento de novas variantes e reduzir a progressão da doença ao induzir as CTLs. Os epítopos usados nestas vacinas foram as proteínas NP e M1 pela sua estabilidade no decurso da doença. Recentemente tem-se usado adenovírus e adjuvantes para otimizar a resposta imune nas vacinas CTLs. (Cargnelutti et al., 2013) (Wong & Webby, 2013)</p>	<p>X Mostrou reduzir a mortalidade em modelos de ratos X Foco é a proteína estável e possibilidade de independência das porções HA e NA mutáveis. (Cargnelutti et al., 2013) (Wong & Webby, 2013)</p>	<p>X Mecanismo atualmente dispendioso pela ausência de investimento X Área desconhecida pelo reduzido número de ensaios clínicos. X A ausência de MHC I pode interferir na otimização da resposta imune. (Cargnelutti, Sánchez, Mattion, & Scodeller, 2013) (Wong & Webby, 2013)</p>

Representação esquemática das novas vacinas idealizadas de acordo com o seu mecanismo, valências comparativamente às vacinas atuais e fragilidades. Fonte dos dados (Cargnelutti et al., 2013) (Wong & Webby, 2013)

Quadro 6: Novas vacinas disponíveis da Influenza – representação do mecanismo da vacina, valências comparativamente às vacinas atuais e as suas fragilidades.

Novas Vacinas disponíveis	Mecanismo	Valências comparativamente às vacinas atuais	Fragilidades da vacina
<p>Vacina Universal</p>	<p>A vacina foca-se na porção constante da glicoproteína HA (HA2) e na porção completa da glicoproteína HA. As vacinas são produzidas em VPLs e usam-se técnicas de engenharia de produção de nanopartículas na produção da porção <i>stem</i> da glicoproteína HA. A porção HA2 contribui para uma resposta tardia e reduzida das células de memória B e plasmócitos em qualquer estirpe do vírus <i>Influenza</i>. Estudos recentes têm evidenciado que a porção HA mutável (HA1) contém porções constantes que podem ser cruciais na indução de resposta imunitária otimizada entre as diferentes variantes do vírus <i>Influenza</i>. A vacina está a ser idealizada e produzida pela empresa <i>Novavax</i>® e encontra-se nas fases I e II de ensaios clínicos. (Chen et al., 2020)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>X Permite uma resposta imune de base e independente da das mutações das diferentes variantes do vírus <i>Influenza</i></p> <p>X Uma vacina com potencial de produção rápida e custo-eficaz.</p> <p>X Possibilidade de redução da vacinas da <i>Influenza</i>. (Chen et al., 2020)(Wong & Webby, 2013).</p>	<p>X Técnica até à data dispendiosa</p> <p>X Desconhecimento dos efeitos adversos e do potencial da vacina</p> <p>X Resposta imune não-otimizada pela ausência da porção conhecida mutável na sua técnica. (Chen, Liu, Tseng, & Ma, 2020)(Wong & Webby, 2013).</p>
<p>Vacinas baseadas na proteína viral M2e</p>	<p>Esta vacina é incluída na extensão de vacina universal. A proteína M2 é uma proteína estável que mantém a sua estrutura no ciclo de vida da <i>Influenza</i>. Estudos mostraram que indivíduos infectados com <i>Influenza A</i> produzem anticorpos contra M2. As vacinas habitualmente são produzidas usando as VPLs, podendo ser associadas a um vírus ou a camada lipídica isolada aliada à glicoproteína HA sintetizada. Outros modelos usam baculovirus, proteínas de hepatite B ou rotavírus. Os adjuvantes permitem uma otimização da resposta imunitária. A vacina está a ser desenvolvida pela empresa <i>Acambis/Sanofi Pasteur</i>® (Mezhenskaya et al., 2019) (Wong & Webby, 2013)</p>	<p>X Proteína estável que permite induzir resposta imune constante, independente das mutações do vírus <i>Influenza</i>.</p> <p>X Foco promissor de vacina Universal da <i>Influenza</i>. (Mezhenskaya et al., 2019) (Wong & Webby, 2013)</p>	<p>X Estudos recentes mostram que a proteína M2 não é imunogénica suficiente.</p> <p>X Estudos mostram que apenas metade dos indivíduos infectados pelo vírus <i>Influenza A</i> produziram anticorpos.</p> <p>X Testado apenas em modelos animais (Mezhenskaya, Isakova-Sivak, & Rudenko, 2019) (Wong & Webby, 2013)</p>

Representação esquemática das novas vacinas idealizadas de acordo com o seu mecanismo, valências comparativamente às vacinas atuais e fragilidades. Fonte dos dados (Chen et al., 2020)(Wong & Webby, 2013) (Mezhenskaya et al., 2019)

Neste sentido, as novas vacinas idealizadas para a Influenza permitem uma produção rápida e com redução de fatores externos indutores de mutações na produção. Para além disso, outros alvos de vacinas prometem induzir uma resposta imune em segmentos constantes e, como tal, permitir uma redução da periodicidade da administração da vacina como da durabilidade dos anticorpos induzidos pela vacina. Consequentemente, permitirão ultrapassar as fragilidades das vacinas atuais e permitirão otimizar a eficácia da vacina, induzindo uma proteção imunitária ao indivíduo.

O interesse da investigação de alternativas de produção e abordagem das vacinas da Influenza tem sido instigado pela pandemia da COVID-19 que permitiu o investimento em métodos alternativos na vacinologia, por forma a obter-se vacinas custo-eficácias cujo tempo de produção seja o mais otimizado possível. Neste âmbito, atualmente, estão a decorrer estudos em humanos no âmbito de alternativas de produção e abordagem de vacinas da Influenza. Em particular, a vacina universal, cujo alvo da vacina é a porção *stem* da glicoproteína HA e que promete induzir uma resposta imunitária duradoura, iniciou a fase I de estudos em humanos em meados de 2020 (Cohen, 2020). Durante o estudo, os cientistas tentaram isolar a porção constante da glicoproteína HA, no entanto, sozinha demonstrou ser instável. Para ultrapassar este obstáculo, associaram segmentos à porção *stem* desconhecidas pelo sistema imunitário do indivíduo por forma a estabilizar a proteína *stem* (Cohen, 2020). O estudo feito da vacina universal evidenciou ocorrer a produção de maior quantidade de anticorpos IgG comparativamente às vacinas atuais que duram entre 6 meses a 18 meses, desconhecendo-se até à data a capacidade neutralizadora induzida pela vacina universal (Nachbagauer et al., 2021).

Em meados de 2021, iniciou-se a fase I de estudo em humanos no âmbito da Vacina VPL no *National Institutes of Health Clinical Center* em Bethesda, Maryland. O estudo engloba participantes entre os 18 e 50 anos sendo que uns recebem a vacina atual da Influenza e outros a vacina experimental. A vacina testada contém informação de múltiplas cópias de quatro glicoproteínas HA diferentes, sendo que a porção *stem* tem demonstrado otimizar a robustez da resposta imunitária (NIH, 2021b). Em modelos de animais, a vacina VPL evidenciou maior produção de anticorpos face a várias variantes do vírus *Influenza* em comparação às vacinas atuais (NIH, 2021b). Paralelamente, estão

a decorrer estudos da vacina VPL em humanos no âmbito da COVID-19 (Institute for Protein Design, 2021).

No dia 22 de junho a empresa Sanofi® e Translate Bio® anunciaram o início da fase I de estudos em humanos da vacina mRNA do vírus *Influenza* num grupo de 280 pessoas entre os 18 e 49 anos de idade, desconhecendo-se dados do estudo até à data da redação do Trabalho Final de Mestrado (Sanofi, 2021).

O investimento na produção de vacinas cujo alvo são porções constantes das glicoproteínas HA e NA ou de outras proteínas imutáveis, permitirá criar anticorpos que sirvam proteção imunológica do indivíduo para diferentes variantes do vírus *Influenza* e, assim, reduzir a morbimortalidade face à proteção que as vacinas atuais fornecem. Para além disso, a dedicação em alternativas de produção face ao atual modelo dependente de ovo, possibilitará a disponibilidade da vacina da Influenza mais rápida e em maior quantidade.

VI A influência da pandemia da COVID-19 no futuro da vacinologia

Em dezembro de 2019, entidades da autoridade chinesa investigavam um *cluster* de casos de uma pneumonia de etiologia desconhecida. Os primeiros casos da COVID-19 fora de Wuhan foram reportados na Alemanha a 27 de janeiro de 2020 e é declarada pandemia a 11 de março de 2020. Em Portugal o primeiro caso da COVID-19 foi declarado a 2 março no Hospital de São João (Kamps Bernd, Sebastian Hoffmann, 2021). Concomitantemente à pandemia pelo vírus SARS-CoV-2, circulava a epidemia habitual da Influenza cujo pico de incidência se inicia em Setembro e termina em Maio do ano civil seguinte. Tanto a Influenza como a COVID-19 são doenças que partilham semelhanças no decurso da doença, tais como o quadro clínico respiratório (como febre, tosse, rinorreia, mialgias), os grupos de risco de severidade de doença (como obesidade, doença cardiovascular, renal, hematológico, imunossupressão, imunodepressão) e a taxa de mortalidade considerável aquando de doença severa.

Por sua vez, na fase inicial da pandemia da COVID-19, as autoridades públicas aconselharam a administração da vacina da Influenza com o intuito de reduzir as idas ao hospital por casos respiratórios não COVID-19, sendo que, estudos recentes demonstraram uma clara diminuição das idas ao Serviço de Urgência pela Influenza durante a pandemia pelo vírus SARS-CoV-2 após a administração da vacina da gripe. No

entanto, as autoridades públicas mitigaram, também, medidas de saúde pública, como o isolamento profilático, uso de máscara facial e higienização das mãos obrigatório, cujos não só permitiu o controlo da propagação de casos pela COVID-19 como se projetou numa redução de casos severos respiratórios nos hospitais, incluindo casos respiratórios pela Influenza (Maltezou, Theodoridou, & Poland, 2020). Pelo menor número de casos de Influenza, teorias têm surgido que depois da cessação das medidas de mitigação para a COVID-19 poderá ocorrer um surto precoce de Influenza devido à imunogenicidade reduzida nas épocas de Influenza passadas e, conseqüentemente, resultar num pico de casos severos e mortes pela Influenza (National, 2021). No entanto, é uma especulação e carece de dados que suportem a teoria. Estudos divergem ao estabelecer a correlação entre a administração da vacina da Influenza com a proteção para a infeção concomitante entre a Influenza e a COVID-19. Inicialmente, estudos indicavam que existia correlação entre a vacina da Influenza com a redução de mortes pela COVID-19 em idosos com mais de 65 anos (Marín-Hernández, Schwartz, & Nixon, 2021) e nas restantes faixas etárias uma redução de mortes de cerca de 35% pela COVID-19 pela indução da memória do Sistema imunitário inato aquando da vacina da Influenza (Fink et al., 2020). Mais recentemente, artigos científicos têm demonstrado que esta correlação é falaciosa e que ainda não é possível fazer uma análise adequada da possível correlação (Skowronski et al., 2020).

Embora haja esforços para encontrar tratamento para doença severa da COVID-19, não existe antivirais que redução a carga viral do vírus SARS-CoV-2 e, assim, o tratamento disponível para a COVID-19 é sintomático caso haja doença ligeira ou moderada e nos casos de doença severa usa-se a corticoterapia e, caso não possa ser usada, recorre-se aos imunomoduladores por forma moldar a resposta sistémica à infeção pela COVID-19 (NIH, 2021a). Por conseguinte, a prevenção de severidade de doença pela vacina da COVID-19 é a alternativa para a redução da mortalidade e da morbilidade. Assim, múltiplas empresas farmacêuticas e aliada a injeção de financiamento permitiu investir em métodos de produção de vacina não convencional e potenciar a custo-efetividade como a rapidez de produção (Vellingiri, Jayaramayya, Iyer, & Narayanasamy, 2020).

Assim, existem várias vacinas candidatas em ensaios clínicos sendo que a EMA aprovou as seguintes: 1. As vacinas vetor - Vaxzevria® da empresa Oxford/AstraZeneca®, COVID-19 Vaccine Janssen® da empresa Janssen®; 2. As vacinas mRNA- Comirnaty® da empresa

Pfizer® e COVID-19 Vaccine Moderna® da empresa Moderna® (Farmacêuticos, 2021); . Por sua vez a FDA aprovou as vacinas COVID-19 Vaccine Moderna®, Comirnaty® da empresa Pfizer® e a COVID-19 Vaccine Janssen® da empresa Janssen® (Medicine, 2021). As vacinas pelo vetor, neste caso o adenovírus, permitem manipular o adenovírus ao adicionar a informação genética da glicoproteína S do vírus SARS-CoV-2. Por sua vez, as vacinas cursam com os seguintes efeitos adversos:

1. Vaxzevria® mais frequentes são dor no local da injeção, mialgia, artralgia, fadiga, febrícula ou febre, mal-estar geral, calafrios, náuseas, vômitos e cefaleias. Por sua vez, a vacina cursa com trombocitopenia sendo que, nos últimos tempos e em casos raros, pode cursar com trombose associada a trombocitopenia e perturbações da coagulação (EMA, 2021d).
2. COVID-19 Vaccine Janssen® como efeitos adversos frequentes são a dor no local de injeção, mialgias, artralgias, cefaleia, náuseas, tosse e fadiga. Por sua vez, em casos muito raros também cursou com trombose associada a trombocitopenia e alterações da coagulação (EMA, 2021c)

A vacina Vaxzevria® mostrou ter 76% de efetividade e 56-74% de eficácia em reduzir doença sintomática e 100% de efetividade em diminuir os casos severos pela COVID-19 após receberem as 2 doses da vacina (Medicine, 2021)(IHME, 2021). Quanto à Janssen®, de dose única, mostrou eficácia de 55%-74% em reduzir a doença sintomática e cerca de 86% contra a doença severa da COVID-19 nos EUA (Medicine, 2021) (IHME, 2021).

As vacinas mRNA usam no seu mecanismo o RNA mensageiro veiculado a nanopartículas que entra nas células do hospedeiro e codifica a proteína *Spike* (S) do vírus SARS-CoV-2. Por sua vez, as vacinas cursam com os seguintes efeitos adversos:

1. Comirnaty® mais frequentes são náuseas, vômitos, diarreia, cefaleias, dor no local da injeção, mialgia e artralgia (EMA, 2021a).
2. COVID-19 Vaccine Moderna® são linfadenopatia, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, dor no local da injeção, febre, arrepios e fadiga (EMA, 2021b).

A vacina Comirnaty® previne em cerca de 95% de eficácia doença da COVID-19 em indivíduos sem infecção prévia e mostrou ter igual imunogenicidade independente das

comorbilidades, idade, etnia e massa corporal. Por sua vez, mostrou reduzir em 100% de efetividade doença severa da COVID-19 (Medicine, 2021)(IHME, 2021).

COVID-19 Vaccine Moderna® evidenciou ter 94,1% de infetividade na prevenção de doença sintomática em doentes que não tiveram infeção prévia pela COVID-19.

Por sua vez, existem duas novas vacinas disponíveis, mas que ainda não foram aprovadas na Europa sendo elas: 1. Curevac® – Vacina de mRNA e 2. Sanofi – GSK® - Vacina proteica recombinante por baculovirus com adjuvante. A vacina Curevac® foi criada no sentido de substituir as vacinas da Pfizer® ao contornar o seu elevado preço e a sua exigência da refrigeração. No entanto, demonstrou uma efetividade de 47% em fases III de estudos em humanos (Dolgin, 2021). A vacina Sanofi-GSK® iniciou a fase III de ensaios clínicos em Londres e Paris em Maio 2021, tendo a fase II demonstrado elevada capacidade de indução de produção de anticorpos neutralizadores, cerca de 95-100%, com apenas uma dose (Sanofi-GSK, 2021a). No entanto, a sua eficácia e efetividade é ainda desconhecida (Sanofi-GSK, 2021b).

Recentemente, surgiram notícias sobre novas vacinas desenvolvidas por portugueses. A vacina da empresa farmacêutica Immunetep®, em Cantanhede, está pronta para iniciar os ensaios clínicos em Portugal, tendo tido resultados promissores na fase pré-clínica (DN, 2021). Também em junho de 2021, reportou-se o desenvolvimento de uma vacina oral da COVID-19 pelo Instituto Gulbenkian de Ciência® (IGC) e o Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier® (ITQB) da Universidade Nova de Lisboa (Público, 2021). A vacina é recombinante em bactéria que, por sua vez, interage com o epitélio intestinal induzindo a resposta imunitária (Público, 2021). Porventura, desconhecem-se os resultados dos ensaios pré-clínicos de ambas as vacinas.

A pandemia da COVID-19 e a corrida pela vacina tem aberto horizontes face a novos mecanismos de produção e alvo de vacinas, permitindo a expansão da área da vacinologia em diversas doenças infecciosas.

Porventura, há ainda pouca evidência quanto ao perfil de segurança, eficácia e efetividade, pelo que as novas vacinas da COVID-19 aprovadas pela Europa têm mostrado que é possível a produção de vacinas em série, custo-efetivas, com proteção

imunológica ao vírus SARS-CoV-2. Têm também demonstrado serem vacinas seguras embora haja reporte de efeitos adversos graves em raras ocasiões.

VII. Conclusões e Perspetivas Futuras

O método de produção atual de vacinas da Influenza tem sido fiel ao mesmo mecanismo desde a década de 40 e, embora se conheça a segurança do método tendo um custo reduzido, a dependência das atuais vacinas de meio de ovo tem as suas fragilidades. De notar que, o atual processo de produção da vacina é moroso com baixa capacidade de ajuste às novas variantes emergentes dada a sua dependência da porção superior mutável das glicoproteínas HA e NA. Subsequentemente, a eficácia e efetividade da vacina reduzem, o que cursa com menor indução de produção de anticorpos, vulnerabilizando o indivíduo a desenvolver quadro clínico severo de Influenza. Para além disso, o meio de ovo exerce pressão mutacional sobre a variante do vírus *Influenza* em crescimento na produção da vacina, o que predispõe o aparecimento de mutações da vacina desenvolvida e redução da sua eficácia. Neste sentido, novas vacinas da Influenza foram aprovadas, como as produzidas em baculovirus e em meio de células, para contornar os obstáculos que o atual processo de produção dispõe, ilustrando uma produção rápida e com flexibilidade no ajuste das combinações HA/NA emergentes. Porventura, cerca de 85% das vacinas produzidas atualmente são vacinas inativadas cujo financiamento dirige-se para a produção em meio de ovo, limitando o estudo tanto da segurança como da eficácia e efetividade das novas vacinas disponíveis e aprovadas. Porventura, tanto as vacinas produzidas em baculovirus como em meio de células são também dependentes das mutações da porção superior das glicoproteínas HA/NA e, como tal, a imunogenicidade induzida é fragilizada face a alterações de HA/NA inesperadas.

Assim sendo, novos modelos de produção de vacina da Influenza têm sido idealizados e prometem novas formas de abordagem de produção rápida e custo-efetiva. A título de exemplo, as vacinas produzidas em vetores (como DNA, mRNA, adenovírus), genética reversa e VPLs. Para além disso, prometem independência da porção mutacional de HA/NA, como as vacinas universais com alvo na porção *stem* da glicoproteína HA e

proteína Me2 como alvos alternativos da indução de resposta imune, o caso das vacinas CTLs. Todavia, até à necessidade de investimento financeiro na vacinologia no contexto da pandemia da COVID-19, são vacinas que carecem de dados de ensaios clínicos no âmbito do vírus *Influenza*, desconhecendo-se o seu perfil de imunogenicidade e segurança.

Porventura, a pandemia pela COVID-19 exerceu pressão para o desenvolvimento de um método de produção de vacina que permita a redução de risco de severidade de doença, visto que o tratamento da COVID-19 curativo antiviral é inexistente. Como consequência, novos modelos idealizados de produção de vacina materializaram-se no contexto da COVID-19, como produção em adenovírus (comumente conhecidas como Vaxzevria® da empresa Oxford/AstraZeneca® e COVID-19 Vaccine Janssen® da empresa Janssen®) e em mRNA (conhecidas como Comirnaty® da empresa Pfizer® e COVID-19 Vaccine Moderna® da empresa Moderna®). As vacinas aprovadas da COVID-19 têm demonstrado ser custo-efetivas, cuja efetividade global é superior a 60% com perfil de segurança adequado e produção rápida. Ainda assim, novos modelos de vacinas têm sido investigados o que tem permitido a expansão da vacinologia.

Concluindo, a pandemia pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 tem sido crucial na mudança do paradigma das vacinas, não só no contexto da COVID-19 como para várias doenças infecciosas, incluindo Influenza e, conseqüentemente, tem potencial de poder instigar estudos clínicos de protótipos de novas vacinas com potencial de otimização da resposta imunitária da vacina da Influenza, possibilitando até indução de resposta imunitária prolongada e com menor necessidade de frequência de administração da vacina.

VIII. Bibliografia

- American, S. (2019). Influenza: A Serious Threat For Adults With Chronic Health Conditions. Retrieved from <https://www.scientificamerican.com/custom-media/influenza-a-serious-threat-for-adults-with-chronic-health-conditions/>
- Angelova, L. A. (1982). Long-term immunity to influenza A(H1N1) in humans. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*, 133(3), 267–272. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0769261782800063>
- Asha, K., & Kumar, B. (2019). Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 192. <https://doi.org/10.3390/jcm8020192>
- Bahadoran, A., Lee, S. H., Wang, S. M., Manikam, R., Rajarajeswaran, J., Raju, C. S., & Sekaran, S. D. (2016). Immune responses to influenza virus and its correlation to age and inherited factors. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01841>
- Baillièrè, J.-B. (1840). *Littré E Oeuvres complètes d'Hippocrate: Volume II*.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., & Ruigrok, R. W. H. (1994). Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO Journal*, 13(13), 3158–3165. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06614.x>
- Belshe, R. B., Edwards, K. M., Vesikari, T., Black, S. V., Walker, R. E., Hultquist, M., ... Connor, E. M. (2007). Live Attenuated versus Inactivated Influenza Vaccine in Infants and Young Children. *New England Journal of Medicine*, 356(7), 685–696. <https://doi.org/10.1056/nejmoa065368>
- Bharatbiotech. (2020). What is an Ideal Vaccine ? Retrieved from <https://www.bharatbiotech.com/blog/what-is-an-ideal-vaccine/>
- Bi, Y., Wong, G., Liu, Y., Liu, L., Gao, G. F., & Shi, Y. (2016). Ribavirin is effective against drug-resistant H7N9 influenza virus infections. *Protein and Cell*, 7(8), 611–614. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0287-0>
- Bin Zhou, Y.-M. D. (2017). Multiplex Reverse Transcription-PCR for Simultaneous Surveillance of Influenza A and B Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Briedis, D. J., & Lamb, R. A. (1982). Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and the mRNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *Journal of Virology*, 42(1), 186–193. <https://doi.org/10.1128/jvi.42.1.186-193.1982>
- Bühler, S., & Ramharter, M. (2019). Flucelvax Tetra: A surface antigen, inactivated, influenza vaccine prepared in cell cultures. *ESMO Open*, 4(1), 2018–2019. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000481>
- Cargnelutti, D. E., Sánchez, M. V., Mattion, N. M., & Scodeller, E. A. (2013). Development of a universal CTL-based vaccine for influenza. *Bioengineered*, 4(6), 374–378. <https://doi.org/10.4161/bioe.23573>
- Carrasco-Hernandez, R., Jácome, R., Vidal, Y. L., & de León, S. P. (2017). Are RNA viruses candidate agents for the next global pandemic? A review. *ILAR Journal*, 58(3), 343–358. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx026>
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Coven, F., Joannis, T., El-Hamid, H. S. A., ... Capua, I. (2011). Evidence for differing evolutionary dynamics of A/H5N1 viruses among countries applying or not applying avian influenza vaccination in poultry. *Vaccine*, 29(50), 9368–9375. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.127>
- Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, I. S. U. A. (2015). Influenza C and Influenza D viruses. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8706-7_9
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Guidance for Clinicians on the Use of Rapid Influenza Diagnostic Tests. *Cdc*, (1), 1. Retrieved from

- http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/clinician_guidance_ridt.htm
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016). How vaccine effectiveness and efficacy are measured. Retrieved from https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectivenessqa.htm?CDC_AA_refVal=https%253A%252F%252Fwww.cdc.gov%252Fflu%252Fprofessionals%25
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018a). How CDC classifies Flu Severity. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/about/classifies-flu-severity.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018b). The Journey of Your Child’s Vaccine. Retrieved from https://www.cdc.gov/vaccines/parents/infographics/journey-of-child-vaccine.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fvaccines%2Fparents%2Finfographics%2Fjourney-of-child-vaccine-text.html
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019a). Immunogenicity, Efficacy, and Effectiveness of Influenza Vaccines. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/immunogenicity.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019b). Inactivated Influenza VIS. Retrieved from <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/flu.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019c). Influenza Historic Timeline. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/pandemic-timeline-1930-and-beyond.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020a). CDC Seasonal Flu Vaccine Effectiveness Studies. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020b). Flu & People 65 Years and Older. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/65over.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020c). Flu Symptoms & Complications. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/symptoms.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020d). Influenza Virus Testing Methods. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/table-testing-methods.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020e). Overview of Influenza Testing Methods. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/overview-testing-methods.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020f). Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2020–21 Influenza Season. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6908a1external icon>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020g). Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-selection.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020h). Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-selection.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020i). The Flu Season. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020j). Vaccine Effectiveness: How Well Do the Flu Vaccines Work? Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/vaccineeffect.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021a). Adjuvanted Flu Vaccine. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/prevent/adjuvant.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021b). Fluzone High-Dose Seasonal Influenza Vaccine. Retrieved from https://www.cdc.gov/flu/prevent/qa_fluzone.htm
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021c). Influenza Antiviral Medications: Summary for

- Clinicians. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021d). Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021e). Live Attenuated Influenza Vaccine [LAIV] (The Nasal Spray Flu Vaccine). Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/prevent/nasalspray.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021f). People at High Risk For Flu Complications. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021g). What are the benefits of flu vaccination? Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-benefits.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021h). Who Should and Who Should NOT get a Flu Vaccine. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/prevent/whoshouldvax.htm>
- Černý, V. (2019). Doporučení pro diagnostiku, prevenci a léčbu sezonní chřipky. *Anesteziologie a Intenzivní Medicina*, 30(2), 97–98. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy866>
- Chen, J. R., Liu, Y. M., Tseng, Y. C., & Ma, C. (2020). Better influenza vaccines: An industry perspective. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-0626-6>
- Cheng, A. C., Macartney, K. K., Waterer, G. W., Kotsimbos, T., Kelly, P. M., & Blyth, C. C. (2017). Repeated vaccination does not appear to impact upon influenza vaccine effectiveness against hospitalization with confirmed influenza. *Clinical Infectious Diseases*, 64(11), 1564–1572. <https://doi.org/10.1093/cid/cix209>
- Cohen, J. (2020). Innovative universal flu vaccine shows promise in first clinical test. Retrieved from <https://www.sciencemag.org/news/2020/12/innovative-universal-flu-vaccine-shows-promises-it-first-clinical-test>
- Cox, M. M. J., & Hollister, J. R. (2009). FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, 37(3), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.014>
- Cox, M. M. J., Izikson, R., Post, P., & Dunkle, L. (2015). Safety, efficacy, and immunogenicity of Flublok in the prevention of seasonal influenza in adults. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 3(4), 97–108. <https://doi.org/10.1177/2051013615595595>
- Cox, R. J., Brokstad, K. A., & Ogra, P. (2004). Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01382.x>
- D.W., N., J.J., T., & M.A., M. (2000). Clinical and laboratory diagnosis of influenza virus infections. *American Journal of Managed Care*, 6(5 SUPPL.), S265–S275. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2000103735>
- Dauber, B., Heins, G., & Wolff, T. (2004). The Influenza B Virus Nonstructural NS1 Protein Is Essential for Efficient Viral Growth and Antagonizes Beta Interferon Induction. *Journal of Virology*, 78(4), 1865–1872. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1865-1872.2004>
- Direção-Geral da Saúde. (2015). Terapêutica e quimioprofilaxia da gripe sazonal. *Orientação Da Direção-Geral Da Saúde*, 1–8.
- Direção Geral da Saúde. (2020). Vacinação contra a gripe. Época 2020/2021. *Norma 016/2020*, 1–6.
- DN. (2021). Vacina portuguesa contra a covid-19 pronta para ensaios clínicos. Retrieved from <https://www.dn.pt/sociedade/vacina-portuguesa-contra-a-covid-19-pronta-para-ensaios-clinicos-13712789.html>

- Dolgin, E. (2021). Modified RNA. *Nature*.
- Domingo, E. (1997). Rna Virus Mutations. *Annual Review of Microbiology*, 51, 151–178.
- Dowdle, W. R. (1998). The principles of disease elimination and eradication. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(SUPPL. 2), 22–25.
- Eickhoff, T. C., & Meiklejohn, G. (1969). Protection against Hong Kong influenza by adjuvant vaccine containing A2-Ann Arbor-67. *Bulletin of the World Health Organization*, 41(3), 562–563.
- EMA. (2021a). Comirnaty Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf
- EMA. (2021b). COVID-19 Vaccine Moderna Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf
- EMA. (2021c). Janssen Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2013.05.004><http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145766><http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0092623X.2013.864368><http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.006><http://www.sciencedirect.com/science/ar>
- EMA. (2021d). Vaxzevria - ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf
- Erlikh, I. V., Abraham, S., & Kondamudi, V. K. (2010). Management of influenza. *American Family Physician*, 82(9), 1087–1095. <https://doi.org/10.2165/00044011-200020060-00007>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (n.d.-a). *Antiviral treatment of influenza*. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control/antivirals>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (n.d.-b). Factsheet about seasonal influenza. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/facts/factsheet>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). Risk groups for severe influenza. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control/vaccines/risk-groups>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). Summary of the influenza 2012–2013 season in the WHO European region. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-influenza-2012-2013-season-who-european-region>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). Summary of the influenza 2013–2014 season in Europe. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-influenza-2013-2014-season-europe>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2016a). Seasonal influenza - Annual Epidemiological Report for 2014-15 season. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2014-15-season>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2016b). Summary of the influenza 2015–2016 season in Europe. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-influenza-2015-2016-season-europe>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). Influenza in Europe, summary of the season 2016–17. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/season-2016-17>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018a). Influenza ranked highest in the burden of

- disease measured in DALYs. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/influenza-ranked-highest-burden-disease-measured-dalys>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018b). Seasonal influenza, 2017 – 2018. *ECDC Annual Epidemiological Report for 2017*, (October), 2017–2018.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Seasonal influenza 2018 – 2019 Annual Epidemiological Report Key facts.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Seasonal influenza 2019-2020 Annual Epidemiological Report Key facts.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). Influenza virus characterisation Summary Europe, February 2021.
- European Medicines Agency. (2007). Guideline on clinical evaluation of new vaccines, (June), 3–19. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-new-vaccines_en.pdf
- Farmacêuticos, O. dos. (2021). VACINAS CONTRA A COVID-19 APROVADAS NA EUROPA. Retrieved from <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/artigos/vacinas-contr-a-covid-19-aprovadas-na-europa/>
- FDA. (n.d.-a). FLUAD FULL PRESCRIBING INFORMATION.
- FDA. (n.d.-b). Flublok FULL PRESCRIBING INFORMATION.
- FDA. (n.d.-c). FLUCELVAX FULL PRESCRIBING INFORMATION.
- FDA. (n.d.-d). FLUMIST FULL PRESCRIBING INFORMATION.
- FDA. (n.d.-e). Full prescribing information for FLUVIRIN®.
- FDA. (2020). Influenza (Flu) Antiviral Drugs and Related Information. Retrieved from <https://www.fda.gov/drugs/information-drug-class/influenza-flu-antiviral-drugs-and-related-information>
- Fernandez-Sesma, A., Marukian, S., Ebersole, B. J., Kaminski, D., Park, M.-S., Yuen, T., ... Moran, T. M. (2006). Influenza Virus Evades Innate and Adaptive Immunity via the NS1 Protein. *Journal of Virology*, 80(13), 6295–6304. <https://doi.org/10.1128/jvi.02381-05>
- Fink, G., Orlova-Fink, N., Schindler, T., Grisi, S., Ferrer, A. P., Daubenberger, C., & Brentani, A. (2020). Inactivated trivalent influenza vaccine is associated with lower mortality among Covid-19 patients in Brazil. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.20142505>
- Fonville, J. M., Wilks, S. H., James, S. L., Fox, A., Ventresca, M., & Aban, M. (2015). Europe PMC Funders Group Antibody landscapes after influenza virus infection or vaccination, 346(6212), 996–1000. <https://doi.org/10.1126/science.1256427.Antibody>
- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., & Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 2002–2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437772100>
- Gentles, L. E., Wan, H., Eichelberger, M. C., & Bloom, J. D. (2020). Antibody neutralization of an influenza virus that uses neuraminidase for receptor binding. *BioRxiv*, 1–10. <https://doi.org/10.1101/2020.05.08.084954>
- Grant, W. (1782). *Observations on the late influenza, the Febris Catarrhalis Epidemica of Hippocrates as it appeared in London in 1775 and 1782*.
- Greenberg, H., & Kemble, G. (2008). Live attenuated influenza vaccine.
- Gupta, Y. K., Meenu, M., & Mohan, P. (2015). The Tamiflu fiasco and lessons learnt. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(1), 11–16. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.150308>

- Hale, B. G., Albrecht, R. A., & García-Sastre, A. (2010). Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiology*, 5(1), 23–41. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.108>
- Hannah Wunsch. (2020). The outbreak that invented intensive care. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01019-y>
- Harding, A. T., & Heaton, N. S. (2018). Efforts to improve the seasonal influenza vaccine. *Vaccines*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines6020019>
- Hatta, M., & Kawaoka, Y. (2003). The NB Protein of Influenza B Virus Is Not Necessary for Virus Replication In Vitro. *Journal of Virology*, 77(10), 6050–6054. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.10.6050-6054.2003>
- He, F., Madhan, S., & Kwang, J. (2009). Baculovirus vector as a delivery vehicle for influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(4), 455–467. <https://doi.org/10.1586/erv.09.2>
- History. (2020a). The Russian flu of 1889: The deadly pandemic few Americans took seriously. Retrieved from <https://www.history.com/news/1889-russian-flu-pandemic-in-america>
- History. (2020b). Why Was It Called the “Spanish Flu?” Retrieved from <https://www.history.com/news/why-was-it-called-the-spanish-flu>
- History of vaccines. (n.d.). All timelines overview. Retrieved from https://www.historyofvaccines.org/timeline#EVT_116
- History of vaccines. (2014). The History of polio. Retrieved from https://www.historyofvaccines.org/timeline#EVT_100335
- History of vaccines. (2021). Vaccine Development, Testing, and Regulation. Retrieved from <https://www.historyofvaccines.org/content/articles/vaccine-development-testing-and-regulation>
- Hoag, H. (2014). Study revives bird origin for 1918 flu pandemic. *Nature*, (February), 1–2. <https://doi.org/10.1038/nature.2014.14723>
- Hussain, M., Galvin, H. D., Haw, T. Y., Nutsford, A. N., & Husain, M. (2017). Drug resistance in influenza a virus: The epidemiology and management. *Infection and Drug Resistance*, 10, 121–134. <https://doi.org/10.2147/IDR.S105473>
- IHME. (2021). COVID-19 vaccine efficacy summary. Retrieved from <http://www.healthdata.org/covid/covid-19-vaccine-efficacy-summary>
- Institute for Protein Design. (2021). Two nanoparticle vaccines enter clinical trials. Retrieved from <https://www.ipd.uw.edu/2021/06/two-nanoparticle-vaccines-enter-clinical-trials/>
- Institute, S. H. (2017). Louis Pasteur. Retrieved from <https://www.sciencehistory.org/historical-profile/louis-pasteur>
- Interactions, D., In, U. S. E., & Populations, S. (2010). Fluzone®, 2–5.
- J.Nelson S.S. Couceiro, J. C. P. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium. *Virus Research*, 29, 155–165.
- Jackson, H. C., Roberts, N., Wang, Z. M., & Belshe, R. (2000). Management of influenza: Use of new antivirals and resistance in perspective. *Clinical Drug Investigation*, 20(6), 447–454. <https://doi.org/10.2165/00044011-200020060-00007>
- Jefferson, T., Jones, M. A., Doshi, P., Del Mar, C. B., Hama, R., Thompson, M. J., ... Heneghan, C. J. (2014). Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014(4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008965.pub4>
- Johnson, B. (n.d.). The Great Plague 1665 – the Black Death. Retrieved from <https://www.historic-uk.com/HistoryUK/HistoryofEngland/The-Great-Plague/>
- Jorge, I. N. R. (2019). Epidemiológica da Gripe.

- Jung, H. E., & Lee, H. K. (2020). Host protective immune Responses against influenza a virus infection. *Viruses*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/v12050504>
- K. Sederdahl, B. (2020). Epidemiology and Clinical Characteristics of Influenza C Virus. Retrieved from <https://viralzone.expasy.org/81>
- Kamps Bernd, Sebastian Hoffmann, C. (2021). *COVID Reference. COVID Reference*. Retrieved from <https://amedeo.com/CovidReference01.pdf>
- Keilman, L. J. (2019). Seasonal Influenza (Flu). *Nursing Clinics of North America*, 54(2), 227–243. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.009>
- Kempińska, B. M., & Woźniak, A. K. (2013). The influenza epidemic of 1889-90 in selected European cities - A picture based on the reports of two Poznań daily newspapers from the second half of the nineteenth century. *Medical Science Monitor*. <https://doi.org/10.12659/MSM.889469>
- Khurana, S., Hahn, M., Coyle, E. M., King, L. R., Lin, T. L., Treanor, J., ... Golding, H. (2019). Repeat vaccination reduces antibody affinity maturation across different influenza vaccine platforms in humans. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11296-5>
- Kim, H., Webster, R. G., & Webby, R. J. (2018). Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunology*, 31(2), 174–183. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>
- Klein, E. Y., Serohijos, A. W. R., Choi, J. M., Shakhnovich, E. I., & Pekosz, A. (2014). Influenza a H1N1 pandemic strain evolution - Divergence and the potential for antigenic drift variants. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093632>
- Kmietowicz, Z. (2017). WHO downgrades oseltamivir on drugs list after reviewing evidence. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 357, j2841. <https://doi.org/10.1136/bmj.j2841>
- Krammer, F. (2019). The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nature Reviews Immunology*, 19(6), 383–397. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0143-6>
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., ... García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Krietsch Boerner, L. (2020). The Flu Shot and the Egg. *ACS Central Science*, 6(2), 89–92. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00107>
- Krishnan, A., Dar, L., Saha, S., Narayan, V. V., Kumar, R., Kumar, R., ... Jain, S. (2021). Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines among children in rural India: A 2-year, randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Medicine*, 18(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003609>
- Kumar, S., & Henrickson, K. J. (2012). Update on influenza diagnostics: Lessons from the novel H1N1 influenza A pandemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 344–361. <https://doi.org/10.1128/CMR.05016-11>
- L.K., S., K., B., D.E., D., & J., K. (2018). The impact of influenza virus infection in pregnancy. *Future Microbiology*, 13(2), 263–274. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L622550238%0Ahttp://dx.doi.org/10.2217/fmb-2017-0096>
- Lamb, R. A., & Krug, R. M. (1996). *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology Lippincott-Raven Press.
- Lamb, R. A., Lai, C. J., & Choppin, P. W. (1981). Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: Colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7 1), 4170–4174. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4170>
- Lamb, Y. N. (2019). Cell-Based Quadrivalent Inactivated Influenza Virus Vaccine (Flucelvax®)

- Tetra/Flucelvax Quadrivalent®): A Review in the Prevention of Influenza. *Drugs*, 79(12), 1337–1348. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01176-z>
- Lau, S. K. P., Li, K. S. M., Huang, Y., Shek, C.-T., Tse, H., Wang, M., ... Yuen, K.-Y. (2010). Ecoepidemiology and Complete Genome Comparison of Different Strains of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Rhinolophus Bat Coronavirus in China Reveal Bats as a Reservoir for Acute, Self-Limiting Infection That Allows Recombination Events. *Journal of Virology*, 84(6), 2808–2819. <https://doi.org/10.1128/jvi.02219-09>
- Lawrence, D. (2004). Obese. *The English Journal*, 93(6), 120. <https://doi.org/10.2307/4128920>
- Lemon, S. M., & Mahmoud, A. A. F. (2005). *The threat of pandemic influenza: Are we ready? Biosecurity and Bioterrorism* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1089/bsp.2005.3.70>
- Luz, F. A. G. Q. (2016). Ensaio Clínico : Evolução Regulamentar, 3–59.
- Maignan, M., Viglino, D., Hablot, M., Masson, N. T., Lebeugle, A., Muret, R. C., ... Larrat, S. (2019). Diagnostic accuracy of a rapid RT-PCR assay for point-of-care detection of influenza A/B virus at emergency department admission: A prospective evaluation during the 2017/2018 influenza season. *PLoS ONE*, 14(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216308>
- Maltezou, H. C., Theodoridou, K., & Poland, G. (2020). Influenza immunization and COVID-19, (January).
- Marín-Hernández, D., Schwartz, R. E., & Nixon, D. F. (2021). Epidemiological evidence for association between higher influenza vaccine uptake in the elderly and lower COVID-19 deaths in Italy. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 64–65. <https://doi.org/10.1002/jmv.26120>
- Martinez, N. E., Sato, F., Kawai, E., Omura, S., Chervenak, R. P., & Tsunoda, I. (2012). Regulatory T cells and Th17 cells in viral infections: Implications for multiple sclerosis and myocarditis. *Future Virology*, 7(6), 593–608. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.44>
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., & Klenk, H.-D. (2004). Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*, 78(22), 12665–12667. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.22.12665-12667.2004>
- Medicine, Y. (2021). Comparing the COVID-19 Vaccines: How Are They Different? Retrieved from <https://www.yalemedicine.org/news/covid-19-vaccine-comparison>
- Mendelsohn, J. A. (2002). ' Like All That Lives ' : Biology , Medicine and Bacteria in the Age of Pasteur and Koch Author (s) : J . Andrew Mendelsohn Source : History and Philosophy of the Life Sciences , Vol . 24 , No . 1 , Selected Papers from a conference held at the Dibner Ins. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 24(1), 3–36.
- Meurens, F. (2020). Flu rna vaccine: A game changer? *Vaccines*, 8(4), 1–4. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040760>
- Mezhenskaya, D., Isakova-Sivak, I., & Rudenko, L. (2019). M2e-based universal influenza vaccines: A historical overview and new approaches to development. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0572-3>
- Mohn, K. G. I., Smith, I., Sjursen, H., & Cox, R. J. (2018). Immune responses after live attenuated influenza vaccination. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 14(3), 571–578. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1377376>
- Montalto, N. J. (2003). An office-based approach to influenza: Clinical diagnosis and laboratory testing. *American Family Physician*, 67(1), 111–118.
- Monto, A. S., Gravenstein, S., Elliott, M., Colopy, M., & Schweinle, J. (2000). Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Archives of Internal Medicine*, 160(21), 3243–3247. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.21.3243>
- Monto, Arnold S. (2008a). Epidemiology of influenza. *Vaccine*, 26(SUPPL. 4), D45–D48. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.066>

- Monto, Arnold S. (2008b). Epidemiology of influenza. *Vaccine*, 26(SUPPL. 4), 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.066>
- Mor, G., & Cardenas, I. (2010). The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>
- Nachbagauer, R., Feser, J., Naficy, A., Bernstein, D. I., Guptill, J., Walter, E. B., ... Krammer, F. (2021). A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. *Nature Medicine*, 27(1), 106–114. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1118-7>
- National, A. R. (2021). Could a more deadly influenza virus emerge after COVID-19? Retrieved from <https://www.abc.net.au/radionational/programs/breakfast/deadly-influenza-virus-could-emerge-after-covid-19/13295106>
- Naveed, Ahsan. (2019). A Review of Strategic Immune Evasion by Influenza Virus and Antiviral Response of Interferon. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, 12(5), 0–6. <https://doi.org/10.19080/aibm.2019.12.555848>
- NIH. (2021a). COVID-19 Treatment Guidelines. Retrieved from <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/whats-new/>
- NIH. (2021b). NIH launches clinical trial of universal influenza vaccine candidate. Retrieved from <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-launches-clinical-trial-universal-influenza-vaccine-candidate>
- Nobusawa, E., & Sato, K. (2006). Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology*, 80(7), 3675–3678. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3675-3678.2006>
- Nogales, A., & Martínez-Sobrido, L. (2017). Reverse genetics approaches for the development of influenza vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms18010020>
- O’Hanlon, R., & Shaw, M. L. (2019). Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. *Current Opinion in Virology*, 35(Table 1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.01.006>
- Oltz, E. M. (2019). Immunity to Influenza: Closing in on a Moving Target. *The Journal of Immunology*, 202(2), 325–326. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1890024>
- Online Etymology Dictionary. (n.d.-a). grippe (n.). Retrieved from <https://www.etymonline.com/word/grippe>
- Online Etymology Dictionary. (n.d.-b). Pandemic | Origin and meaning of pandemic by online etymology dictionary. Retrieved from <https://www.etymonline.com/word/pandemic>
- Orenstein, W. A., Bernier, R. H., Dondero, T. J., Hinman, A. R., Marks, J. S., Bart, K. J., & Sirotkin, B. (1985). Field evaluation of vaccine efficacy. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6), 1055–1068.
- Osterholm, M. T., Kelley, N. S., Sommer, A., & Belongia, E. A. (2012). Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(1), 36–44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70295-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X)
- Pappas, C., Aguilar, P. V., Basler, C. F., Solórzano, A., Zeng, H., Perrone, L. A., ... Tumpey, T. M. (2008). Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3064–3069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711815105>
- Pasteur, S. (n.d.). FLUZONE® High-Dose Influenza Virus Vaccine Trivalent Types A and B (Split Virion).
- Peck, K. M., & Luring, A. S. (2018). Complexities of Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 92(14), 1–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.01031-17>

- Pinto, L. H., Holsinger, L. J., & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, *69*(3), 517–528. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90452-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90452-1)
- Plotkin, S. A., & Plotkin, S. L. (2011). The development of vaccines: How the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(12), 889–893. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2668>
- Prevention, C. for D. C. and. (2019). 2018-2019 Estimated Influenza Illnesses, Medical visits, Hospitalizations, and Deaths and Estimated Influenza Illnesses, Medical visits, Hospitalizations, and Deaths Averted by Vaccination in the United States.
- Público. (2021). Covid-19: cientistas portuguesas estudam potencial vacina oral. Retrieved from <https://www.publico.pt/2021/06/29/ciencia/noticia/covid19-investigadores-portuguesas-estudam-potencial-vacina-oral-1968393>
- Pushko, P., & Tretyakova, I. (2020). Influenza virus like particles (VLPs): Opportunities for H7N9 vaccine development. *Viruses*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/v12050518>
- Ramanathan, K., Antognini, D., Combes, A., Paden, M., Zakhary, B., Ogino, M., ... Brodie, D. (2009). Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Justin Lessler, Nicholas G Reich, Ron Brookmeyer, Trish M Perl, Kenrad E Nelson, Derek A T Cummings*, (January), 19–21.
- Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., Ren, Y., ... Wang, L. (2011). Rates of mutation and host transmission for an escherichia coli clone over 3 years. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026907>
- Rguig, A., Cherkaoui, I., McCarron, M., Oumzil, H., Triki, S., Elmbarki, H., ... Youbi, M. (2020). Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Morocco. *BMC Public Health*, *20*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09145-y>
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Department of Pathology, Baylor University Medical Center, Dallas, Texas*. <https://doi.org/10.1177/000992287201100115>
- Rockman, S., Laurie, K. L., Parkes, S., Wheatley, A., & Barr, I. G. (2020). New technologies for influenza vaccines. *Microorganisms*, *8*(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111745>
- Rodrigo, C., & Méndez, M. (2012). Clinical and laboratory diagnosis of influenza. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *8*(1), 29–33. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.18924>
- Rodrigues, A. P., Silva, S., Torres, A. R., & Machado, A. (2019). *RelatorioPNVG_2018-2019*. Retrieved from http://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/10/RelatorioPNVG_2018-2019.pdf
- Rothberg, M. B., & Haessler, S. D. (2010). Complications of seasonal and pandemic influenza. *Critical Care Medicine*, *38*(SUPPL. 4), 91–97. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c92eeb>
- Rozo, M., & Gronvall, G. K. (2015). The reemergent 1977 H1N1 strain and the gain-of-function debate. *MBio*, *6*(4), 1–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01013-15>
- Rubio, A. P., & Eiros, J. M. (2018). Cell culture-derived flu vaccine: Present and future. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *14*(8), 1874–1882. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1460297>
- Sabbaghi, A., Miri, S. M., Keshavarz, M., Zargar, M., & Ghaemi, A. (2019). Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Reviews in Medical Virology*, *29*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1002/rmv.2074>
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, *84*(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/jvi.00694-10>
- Sanofi-GSK. (2021a). Sanofi and GSK initiate global Phase 3 clinical efficacy study of COVID-19 vaccine candidate. Retrieved from <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2021/2021-05-27-07-30-00-2236989>
- Sanofi-GSK. (2021b). The Adjuvanted Recombinant Protein-based Vaccine Candidate. Retrieved from

<https://www.sanofi.com/en/our-covid-19-vaccine-candidates/recombinant-vaccine#>

- Sanofi. (2021). Sanofi and Translate Bio initiate Phase 1 clinical trial of mRNA influenza vaccine. Retrieved from <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2021/2021-06-22-07-00-00-2250633>
- Skowronski, D. M., Tweed, S. A., & De Serres, G. (2008). Rapid decline of influenza vaccine-induced antibody in the elderly: Is it real, or is it relevant? *Journal of Infectious Diseases*, *197*(4), 490–502. <https://doi.org/10.1086/524146>
- Skowronski, D. M., Zou, M., Clarke, Q., Chambers, C., Dickinson, J. A., Sabaiduc, S., ... De Serres, G. (2020). The impact of influenza vaccination on the COVID-19 pandemic? Evidence and lessons for public health policies. *Clinical Infectious Diseases*, *71*(16), 2285–2288. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa626>
- SpringerLink. (2013). Disease Severity. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_1385
- Steinhauer, D. A. (1999). 1999 Steinhauer Role of Hemagglutinin Cleavage for, *20*, 1–20. Retrieved from [papers3://publication/uuid/B5870BA5-3BED-4BFA-BD87-0710BF1496E4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_1385)
- Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, *8*(8), 1580–1591. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>
- Tang, D. C. C., Zhang, J., Toro, H., Shi, Z., & Van Kampen, K. R. (2009). Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, *8*(4), 469–481. <https://doi.org/10.1586/erv.09.1>
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *3*, 499–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Thein, M. M., Goh, L. G., & Phua, K. H. (1988). The smallpox story: from variolation to victory. *Asia-Pacific Journal of Public Health / Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health*, *2*(3), 203–210. <https://doi.org/10.1177/101053958800200313>
- Tregoning, J. S., Russell, R. F., & Kinnear, E. (2018). Adjuvanted influenza vaccines, *14*(3), 550–564.
- UptoDate. (n.d.-a). Influenza diagnostic tests for respiratory specimens. Retrieved from https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ID%2F69655&topicKey=EM%2F6072&source=see_link
- UptoDate. (n.d.-b). Patient education: Influenza symptoms and treatment (Beyond the Basics). Retrieved from <https://www.uptodate.com/contents/influenza-symptoms-and-treatment-beyond-the-basics>
- Uyeki, T. M., & Al., E. (2018). Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza. *Infectious Diseases Society of America*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy866>
- van der Sandt, C. E., Kreijtz, J. H. C. M., & Rimmelzwaan, G. F. (2012). Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*, *4*(9), 1438–1476. <https://doi.org/10.3390/v4091438>
- Vellingiri, B., Jayaramayya, K., Iyer, M., & Narayanasamy, A. (2020). COVID-19: A promising cure for the global panic, (January).
- Vemula, S. V., Zhao, J., Liu, J., Xue, X. W., Biswas, S., & Hewlett, I. (2016). Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses*, *8*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/v8040096>
- Vries, R. D. De, & Rimmelzwaan, G. F. (2016). Viral vector-based influenza vaccines, *12*(11), 2881–2901.

- WHO. (n.d.-a). Influenza – estimating burden of disease. Retrieved from <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/seasonal-influenza/burden-of-influenza>
- WHO. (n.d.-b). Influenza vaccination coverage and effectiveness. Retrieved from <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/vaccination/influenza-vaccination-coverage-and-effectiveness>
- WHO. (2020). Manufacturing, safety and quality control of vaccines. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/manufacturing-safety-and-quality-control>
- WHO. (2021). *Genomic sequencing of SARS-CoV-2*. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>
- Wong, S. S., & Webby, R. J. (2013). Traditional and new influenza vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 476–492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>
- World Health Organization. (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. *World Health Organization 2011*, 153.
- Yamayoshi, S., & Kawaoka, Y. (2019). Current and future influenza vaccines. *Nature Medicine*, 25(2), 212–220. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0340-z>
- Zebedee, S. L., & Lamb, R. A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology*, 62(8), 2762–2772. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.8.2762-2772.1988>