



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Concurso Público para provimento efetivo de vagas no cargo de
Professor da Carreira de Magistério Superior

Edital UFRJ nº 54, de 30 de janeiro de 2024 (Consolidado com
seus editais de retificação) Versão inicial publicada no DOU em:
02/02/2024 | Edição: 24 | Seção: 3 | Página: 71 a 80, código
MC-056 – Setor: Virologia/Desenvolvimento de estratégias para
prevenção e controle de viroses emergentes e reemergentes de
importância em saúde humana – Departamento de Virologia –
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – CCS – UFRJ.

PROVA ESCRITA

CANDIDATO: 656193

1

Ponto 6: Antivirais e mecanismos de resistência

A descoberta e/ou desenvolvimento de antivirais é de enorme importância (juntamente com outras medidas) para o controle de surtos e epidemias, para a redução da morbidade, ~~seguitas~~ possíveis sequelas causadas por determinados vírus, bem como redução da mortalidade. Além disso, os antivirais frequentemente são uma ferramenta muito útil para a elucidação/melhor compreensão das etapas e mecanismos da replicação viral, sendo muito utilizado em pesquisa básica para tal. Um dos grandes desafios ~~para~~ ^{para} o desenvolvimento de antivirais potentes é a seleção de variantes de escape à ação destes antivirais. ~~Devido à~~ ^{Existe uma} enorme variabilidade de vírus, contendo diferentes tipos de material genético (DNA ou RNA), diferentes ~~etapas~~ que podem ser ainda de fita simples ou fita-dupla, ~~ou~~ além de material

②

genético com segmentos (como no caso dos ortomixovírus, por exemplo), além de vírus que possuem uma característica muito peculiar, como a capacidade de fazer a produzir DNA a partir de RNA e, portanto, precisam possuir uma enzima transcriptase reversa, conferindo a eles mecanismos únicos de replicação de seu genoma (como os vírus das classes VI e VII de Baltimore, como exemplos ~~os~~ ~~retro~~ a família Retroviridae e a família Hepadnaviridae, respectivamente) e de ~~Além disso~~, os vírus possuem diferentes arranjos estruturais, podem ser envelopados ou não e podem utilizar diferentes mecanismos de entrada. Sendo isto exposto é muito difícil (~~até~~ até impossível) a criação de antivirais de amplo espectro, que atuem em ~~difer~~ diversas famílias virais.

Mesmo que ~~se~~ um pan-antiviral seja existente no início, cada vírus, com suas estratégias peculiares de replicação, podem ter diferentes mecanismos de resistência aos antivirais selecionados.

Considerando as etapas de um ciclo replicativo viral, abordarei as diferentes classes de antivirais, com exemplos e ao longo do texto também abordarei os mecanismos de resistência.

Inibidores de entrada/fusão: A primeira etapa para uma infecção da célula hospedeira por um vírus é que este último seja capaz de entrar na célula. A entrada requer a interação de proteínas virais com algum receptor ^{específico} na membrana da célula.

Como exemplo de inibidor de entrada, muitos vírus ainda requerem um segundo receptor para a sua entrada (um co-receptor). Um exemplo de antiviral que inibe a entrada do vírus é o Maraviroc, que é uma molécula que impede a interação da proteína de envelope do *Lentivirus humindef1* (mais conhecido como HIV-1) com o co-receptor CCR5, inibindo assim as etapas posteriores a interação com o receptor CD4 e co-receptor CCR5, que seriam mudanças conformacionais na espícula viral que exporiam peptídeos de fusão em gp41 e permitiriam a fusão do envelope viral com a membrana da célula, liberando o capsídeo viral no citoplasma. Vale ressaltar que o HIV-1 também pode usar outro co-receptor, como o ~~CCR4~~ CXCR4 para a entrada. O tropismo pelo uso de um ou outro receptor é dado por variabilidades nas glicoproteínas do envelope viral.

Um outro exemplo de inibidor de entrada é a Amantadina, um antiviral que já foi utilizado no tratamento de Influenza A. Os vírus influenza são vírus RNA segmentados e envelopados e entram por endocitose. Os vírus, dentro do endossoma, precisam que seu envelope se funda com a membrana endossomal, essa fusão é dependente de ~~pH~~ acidificação endossomal. No envelope viral temos o canal iônico formado pela proteína M₂ que permite a entrada de íons H⁺ dentro da partícula viral, ^{etapa} necessária também para o

(1)

a fusão e liberação do material genético no citoplasma. Ao se ligar ao canal iônico a montadina bloqueia o transporte de H^+ , impedindo a fusão, ~~e o vírus, assim~~ abortando as demais etapas do ciclo replicativo viral.

Diversas variantes de escape à ação deste medicamento já foram observadas, e em geral ~~uma seq. vírus~~ vírus mutantes, com substituições de aminoácidos na região do canal formado, não permitindo mais a interação com o antiviral, são selecionadas e fixadas. No caso de influenza vírus, um outro fator que pode contribuir para a rápida adaptação a pressão seletiva imposta por determinado antiviral é a capacidade do rearranjo dos segmentos virais quando, por exemplo, dois ou mais vírus infectam uma mesma célula (genetic shift). Mesmo que um deles seja sensível ao antiviral, devido a possíveis rearranjos, a progênie viral resultante pode ter uma combinação de segmentos de ambos os vírus (o que é bem comum) e esta progênie com que carrega um segmento que ~~expressará a~~ ~~proteína M~~ do vírus resistente ao antiviral também será resistente e terá uma capacidade replicativa maior que a outra no meio com antiviral, sofrendo pressão seletiva positiva e fixando esta nova variante de escape como a população majoritária num indivíduo em tratamento, resultando ~~em~~ na ineficiência do tratamento e permitindo que

(5)

esta nova variante seja transmitida a outros indivíduos)

Outro tipo de classes de antivirais muito estudadas são os inibidores das polimerases virais. Temos uma vasta gama destes inibidores que atuam em diferentes vírus, de acordo com várias características que falarei ao longo do texto. Basicamente temos inibidores análogos a nucleotídeos, análogos a nucleosídeos e não análogos a nucleosídeos. Os inibidores análogos a nucleotídeos e nucleosídeos em geral são terminadores de cadeia, ou seja, eles são adicionados à cadeia nascente, mas como ~~o~~ não são nucleotídeos verdadeiros, a síntese da cadeia não pode continuar. Exemplos de inibidores ^{análogos a} nucleosídeos: nevirapina (inibidor da transcriptase reversa do HIV), Zidovudina (mesma ~~descreve~~ informação descrita nos parênteses acima). ^{são comu-} ~~lecionadas~~ ^{mente se} Já inibidores não nucleosídicos da TR são inibidores que inibem a enzima de forma alostérica, não são incorporados à cadeia nucleotídica. Exemplos: Efavirenz, que inibe a TR do HIV. ~~Ala~~ Existem também inibidores de integrase (ainda falando do HIV-1). Como este vírus sintetiza um DNA dupla fita que precisa ser integrado ao genoma celular para a continuidade do ciclo, o vírus carrega a proteína integrase, que desempenhará esta função. A primeira linha de tratamento ao HIV-1 no SUS atualmente consiste no uso de ~~o~~

6

um inibidor de integrase (associado a outras classes de antirretrovirais) que é o Deltegravir.

~~Barro~~ ~~HH~~ & Antivirais contra HIV de longe foram os mais estudados e desenvolvidos inclusive utilizando modelamento de proteínas, análise da estrutura de enzimas virais, ~~na~~ ~~as~~ docking, etc. Hoje em dia tem-se diversas opções de combinações de tratamento, o que ajuda assim, não impede a falha terapêutica, se der-se a diferentes motivos, como a adesão inconsistente ao tratamento, a não transposição de medicamentos a barreira hematoencefálica, o que permite a replicação no cérebro, mesmo na presença de antivirais eficientes e em dosagem adequada no paciente. Mas uma ~~fator~~ ~~ampl~~ característica muito importante do vírus é a ausência de mecanismos de "proof reading" na TR viral ~~de~~ que, como consequência, acarreta numa maior taxa de mutações/genoma/ciclo replicativo, propiciando uma variedade de quasiespécies que podem apresentar mutações de resistência e serem positivamente selecionadas e fixadas.

Outros tipos de antivirais temos os inibidores de proteases virais, que são essenciais para a formação e maturação dos vírus, já que muitos vírus expressam as proteínas como poliproteínas, que precisam ser clivadas para a formação da estrutura

do capsídeo viral, por exemplo. Exemplo deste tipo de antiviral: lopinavir.

Existem também os inibidores de saída dos vírus, como, por exemplo, o oseltamivir que é um antiviral contra influenza, no qual uma ~~da~~ região da molécula mimetiza a neuraminidase e é incorporada ao vírus, porém não tem a função de clivar o ácido siálico, o que mantém os vírus presos à célula.

Tópico 4: Replicação de vírus com genoma de DNA:

Os vírus com genomas DNA são bem diversos em tamanho, forma do genoma, que pode ser circular, linear, etc, bem como fita simples, fita dupla ou fita-dupla descontínua (com gaps), como no caso dos vírus da classe VII de Baltimore.

Temos famílias virais que são mais dependentes da maquinaria celular para a replicação, e outras menos dependentes. Os poxvírus por exemplo, pertencentes aos vírus gigantes, de fato possuem um material genético &

(7)

grande, permitindo a codificação para diversas proteínas necessárias à sua replicação, de modo que ele seja ~~totalmente~~ independente da maquinaria celular de replicação de DNA e transcrição. Obviamente como todos os vírus, ainda dependem da maquinaria de tradução celular e da síntese lipídica para a formação de seu envelope. Os pox vírus tem sua replicação ~~totalmente~~ exclusivamente no citoplasma. Ao entrar na célula e ~~desfazer-se~~, a RNA polimerase viral, que vem acoplada ao seu genoma na partícula, inicia-se a transcrição dos genes iniciais, que incluem fatores de transcrição para os genes ~~intermediários~~ intermediários, fatores de evasão de resposta imune celular, entre outros. Os genes intermediários então são transcritos, dando origem a dentre eles e traduzidos, dando origem a proteínas como a DNA polimerase viral e outros fatores de transcrição para os genes tardios, entre outros. A DNA polimerase viral então inicia a replicação do DNA viral, de forma semelhante ao modo de replicação do DNA celular, com origem de replicação e formação de forquilha de replicação. Neste período os genes estruturais também estão sendo expressos e traduzidos, ~~em~~ alguns fatores de transcrição tardios, assim como a RNA pol viral, ~~que~~ Estes fatores tardios, a RNA pol viral e o genoma são empa

(9)

captados na partícula, que passa ainda por algumas etapas complexas dentro da célula, adquirindo seu/seus envelopes, ~~estando~~ e sendo liberada para infectar uma nova célula.

Outros vírus ~~que~~ também são bem independentes da maquinaria celular, embora não tanto quanto os Pox vírus, são os ~~vírus~~ adenovírus e herpes vírus. As diferenças maiores deles em relação aos Pox vírus é que eles necessitam da RNA pol. II celular (Os Adenovírus também usam a RNA pol. III celular para a transcrição de alguns genes iniciais). Uma característica interessante dos herpes vírus é que o seu genoma é circularizado, formando um epissooma no núcleo da célula, que é replicativo, mas vale lembrar que estes vírus também podem ser latentes, com e para isso expressam apenas um pequeno conjunto de genes que induzem e mantêm a latência. ~~Para a replicação do DNA dos herpes vírus ocorre a formação de concatâmeros, que são resolvidos de toda a montagem do capsídeo viral é feita no núcleo. A divisão do ciclo replicativo dos herpes é semelhante ao dos pox, com fase iniciais intermediárias e tardias, já para os adenovírus a divisão é mais simples (fase inicial e tardia).~~

Agora abordarei os mecanismos de replicação dos hepadnavírus, usando como modelo o

cotados na partícula, que passa ainda por algumas etapas complexas dentro da célula, adquirindo o envelope viral e podendo ser liberada para iniciar um novo ciclo.

o vírus da hepatite B (HBV). Como citado anteriormente, estes são vírus DNA com a fita dupla parcial. Após sua entrada na célula estes "gaps" são resolvidos pela DNA polimerase celular, formando uma dupla-fita de DNA completa, de forma circular, conhecida como círculo covalentemente fechado, ou CCC (derivado do inglês). A fita com gaps circuturiza antes da ação da DNA pol (esqueci de mencionar anteriormente). ~~Este DNA circular é replicado formando concatâmeros de DNA~~

Diferentes RNAs são sintetizados pela RNA polimerase II celular. Um deles, o RNA de 3.5 Kb dará origem a diferentes proteínas, como a proteína do core, a polimerase viral (transcriptase reversa) e outros RNAs de menor tamanho darão origem as demais proteínas virais, e ~~fa~~ como HbS, ~~HbS~~ etc além de fatores de transcrição. Após a formação das proteínas do core e da TR, estas ~~são direcionadas~~ o RNA m de 3.5 Kb é empacotado junto com a TR no core viral, que é direcionado do núcleo para o citoplasma pela rede trans golgi. Ainda no núcleo e durante o transporte na rede trans golgi, a TR inicia a transcrição reversa, a par-

(11)

tirar o RNA, formando uma fita complementar de DNA. Já a porção RNase H da TR destrói o RNA e a segunda fita de DNA começa a ser formada. Devido ao reduzido pool de nucleotídeos dentro do capside viral, estes vírus são liberados com dupla-fitas de DNA incompletas em seu interior, que só serão completadas em um novo ciclo de replicação numa nova célula.

Por último abordarei as estratégias de replicação dos vírus de DNA fita simples (Classe II de Baltimore), como os das famílias Parvoviridae, Polyomaviridae e Papillomaviridae. Usarei como modelo os parvovírus, mas apontarei as principais diferenças ao longo do texto.

Os parvovírus são muito pequenos, portanto codificam para poucas proteínas, logo são muito dependentes da maquinaria celular. Eles precisam que a célula entre espontaneamente na fase S para que entrem no núcleo e ~~como~~ tenham seu DNA fita simples convertido em DNA fita dupla pela DNA pol. celular. O mesmo ocorre para os poli e papillomavírus, porém estes vírus carregam consigo fatores que modulam o ciclo celular induzindo a célula a entrar na fase de síntese. Como exemplo, os papillomavírus têm ~~fata~~ proteínas que interagem com p53 e com a proteína de retinoblastoma, alterando

12

o ciclo celular e induzindo a fase S.

Voltam após a formação do DNA dupla fita, há a expressão de proteínas não estruturais como a NS1 e NS2 de parvovirus (a transcrição destes genes ~~também~~ é feita pela RNA pol II celular). Após a síntese destas proteínas no citoplasma elas voltam ao núcleo e se ligam ao DNA viral, formando um grampo (hairpin). A replicação do DNA é então feita pelo mecanismo de grampo circulante (ou rolling hairpin).

Após a expressão das proteínas estruturais (que ocorre mais ao final do ciclo após a expressão das NS1 e NS2) e a replicação do DNA viral, as partículas são montadas e liberadas para o início de novo ciclo replicativo em uma nova célula.

Tópico 9: Genética e evolução de víruses emergentes e reemergentes.

(13)

A virosfera é muito diversa e complexa, e embora os vírus sejam modelos nos quais podemos observar experimentalmente o papel da seleção natural em tempo real, em curto espaço de tempo, ainda há muito mais a se elucidar sobre a evolução dos vírus, bem como sobre a origem dos vírus. Sabemos hoje em dia que os vírus não tiveram uma origem única, são um grupo polifilético.

Comencarei o tópico abordando a genética dos vírus e posteriormente abordarei os principais aspectos acerca da evolução viral, explicando um pouco das forças dos mecanismos que estão envolvidos na evolução viral das populações virais, tais como o cruzamento da barreira entre espécies, as recombinações virais, com transferência horizontal de genes, que ocorrem por diferentes maneiras, os rearranjos virais, em especial o "genetic shift", já explicado brevemente no tópico de "Antivirais e mecanismos de resistência", o "bottleneck" encontrado na transmissão tanto inter espécies quanto intra espécies, que influencia na diminuição da variabilidade genética, também a seleção natural e deriva genética ~~moda~~ contribuem para a evolução viral e mecanismos mais complexos de se estudar, como a epistasia (quando um gene ^{expresso} ~~expresso~~ pode anular o efeito de outro).

14

de um outro gene, além da maior variabilidade genética, com a formação do que chamamos de quasipécies, em vírus RNA, quando comparados a vírus de DNA, que é, em parte, explicada pela menor fidelidade das RNA pol RNA dependentes virais quando comparados as DNA pols, sejam elas virais ou celulares. A menor fidelidade se dá pela não capacidade de exonuclease de algumas RNAs pol e a falta de mecanismos de proof-reading como observamos claramente na RTA trans criptase reversa do HIV, por exemplo.

Sobre a estrutura genética dos vírus:

→ Os ^{genomas dos} vírus podem ser formados por DNA ou RNA, ~~ou seja, uma fita de RNA~~

→ Os genomas podem ser de fita simples ou dupla

→ No caso dos genomas de RNA, eles podem ser fita simples, a fita genômica pode ter polaridade positiva, ou seja, esta fita já é um RNA mensageiro e pode ser traduzida assim que entra na célula (exceção - classe VI de Baltimore, os retrovírus) ou podem ser de polaridade negativa. Neste caso precisam se sintetizar um RNA complementar, que poderá então ser usado p/ produção de RNAs mensageiros. Ainda podemos ter RNA fita simples ambissenso

→ Os genomas podem ser lineares, circulares, podemos ter genomas segmentados e ainda podemos ter genomas diploides como no HIV, por ex.

Existe uma classificação, que não é taxonômica, mas nos auxilia a agrupar os ~~mecanismos~~ vírus de forma que possamos entender melhor os mecanismos de replicação, que é a classificação de Baltimore. Esta classifica os vírus em 7 classes, segundo a "busca pelo RNA" as etapas até chegar no RNA mensageiro viral.

Voltando a organização genômica, vale ressaltar que, embora tenhamos uma grande variabilidade em relação ao tamanho do genoma os vírus são os que possuem, em geral, os menores genomas, quando comparados a bactérias ou eucariotos (embora tenhamos algumas exceções quando nos voltamos para alguns vírus gigantes, como o mimivírus, pandoravírus, etc).

Em geral a economia de espaço é necessária para que o maior número de genes dos vírus possível seja codificado num genoma pequeno. Desta forma, não observamos sequências não codificantes em quantidade, como vemos nos eucariotos (com genes com muitos introns e sequências repetitivas não codificantes, como os STRs).

Uma outra forma de economia de espaço usada pelos vírus é a uma ORF dar origem a poliproteínas, que posteriormente serão clivadas em seus produtos finais. Além disso, overlapping de ORFs é bem comum, bem como mecanismos de frame shift, que permite a expressão de diferentes RNAs que codificam p/poliproteínas.

(16)

em diferentes taxas. Outro mecanismo muito utilizado é o splicing alternativo, que aumenta a versatilidade das proteínas expressas, ~~em~~ principalmente quando são usados sítios ótimos vs subótimos para o splicing, o que também impacta nas diferentes taxas de expressão de proteínas.

Quanto ao RNA vírus, ~~como~~ os coronavírus, são os que possuem maior genoma. Uma estratégia para empacotá-lo em um capsídeo que, estruturalmente tem tamanho limite, é o empacotamento do RNA com proteínas de nucleocapsídeo, semelhante ao que observamos ao fazer um paralelo com o empacotamento do DNA celular de eucariotes com histonas, com posterior envelopamento.

Voltando agora a falar mais de evolução viral, a maioria dos vírus humanos tem sua origem de vírus de outros hospedeiros ~~na~~ vertebrados. O cruzamento da barreira entre espécies é um evento muito comum; embora o definitivo estabelecimento do vírus na nova espécie seja menos comum. Existe um gargalo muito estreito na transmissão entre espécies, devido a ~~7~~ respostas dos hospedeiros, variabilidade de proteínas, etc, de modo que diversos eventos devam ocorrer até que algum vírus tenha sucesso em se estabelecer no novo hospedeiro. As pressões

Phosphorylation

~~Antivikars~~

E a descob de antígenos que a uam em
uma phy de enzimática pa exp de
diagnose e ^{comprova} inclusive uma forma
importantes p. oclus. de t. e. p. do ac
replicação viral.

2. Entrega $\rightarrow$ ~~3 CRT~~ ~~algoritmo~~ ~~no~~ ~~entregado~~

I de des nudam Amanda line

In. nucleosídicos $\rightarrow$ ~~Formin.~~ ~~Sai~~ ~~Calo~~ ~~endoss.~~

~~↳ Simbica, alost.~~

mas não usou
resist. el. resist.
e exigência de aas
no canal MZ, in permit. +5.

Aciclovir $\rightarrow$ HSV & Varicella-Zoster

ganciclovir - α -análogo, usado em geral p/ Andar o HCMV, $\text{Am} + \text{IA} + \text{X} + \text{eficaz}$ $\text{comp} / \text{CTHS V}$ guanosina p_g inibe monofosforil desidrogenase