

1



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: 342090

4. Replicação de vírus com genoma DNA

Os vírus são agentes patogênicos compostos por proteínas virais, ácido nucleico e, em alguns casos, uma membrana de bicamada lipídica. São agentes ~~muito~~ muito diversos quanto ao seu material genômico, podendo ser compostos de DNA fita simples, DNA fita dupla, RNA fita simples polaridade positiva, RNA fita simples polaridade negativa, RNA fita dupla, RNA com intermediário de DNA e DNA com intermediário de RNA.

Os vírus DNA terão ~~o~~ a replicação do seu genoma acontecendo no núcleo da célula ~~hospedeira~~ hospedeira, porque será nesse ambiente em que eles encontrarão o material necessário para a biossíntese de novas moléculas de DNA genômico. ~~A~~ exceção são os poxvírus que conseguem se replicar no citoplasma.

A replicação do DNA viral é realizada por DNA polimerases virais ou celulares. A replicação é realizada sempre no sentido $5' \rightarrow 3'$, lendo a fita molde no sentido $3' \rightarrow 5'$. Pode ser primer 

②

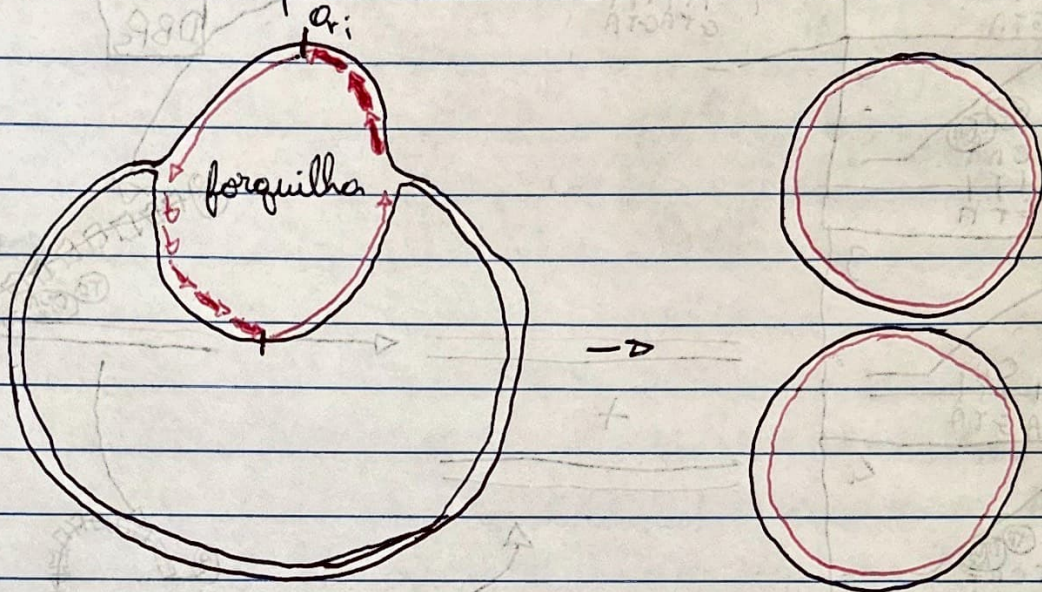
dependente ou independente, sendo os primers formados por proteínas ou ácidos nucleicos. Os tipos de replicação de vírus DNA são por forquilha de replicação, onde a dupla fita de DNA é desamada na região da origem de replicação (Ori), ou através do deslocamento de fita.

Uma vez que a replicação de DNA ~~precisa~~ da célula hospedeira acontece, ~~que~~ assim como a atividade de toda sua maquinaria de replicação quando ela se encontra em fase de síntese (fase S), os vírus DNA precisam aguardar a célula hospedeira a entrar em fase S, induzir a entrada através da ~~regulação~~ regulação de proteínas ~~celulares~~ celulares como p53 e proteína de retinoblastoma, ou (como no caso dos pox vírus) codificar todas as proteínas necessárias para a síntese de DNA e dNTPs. ~~Os~~ ~~vírus~~ Vírus DNA com genomas pequenos, ~~que~~ são mais dependentes da maquinaria celular ~~de~~ de replicação de DNA, enquanto os de genoma maior são menos dependentes uma vez que esses codificam sua própria maquinaria de replicação de DNA. Ao longo do processo evolutivo, foram selecionadas diferentes estratégias de replicação do DNA viral, são elas:

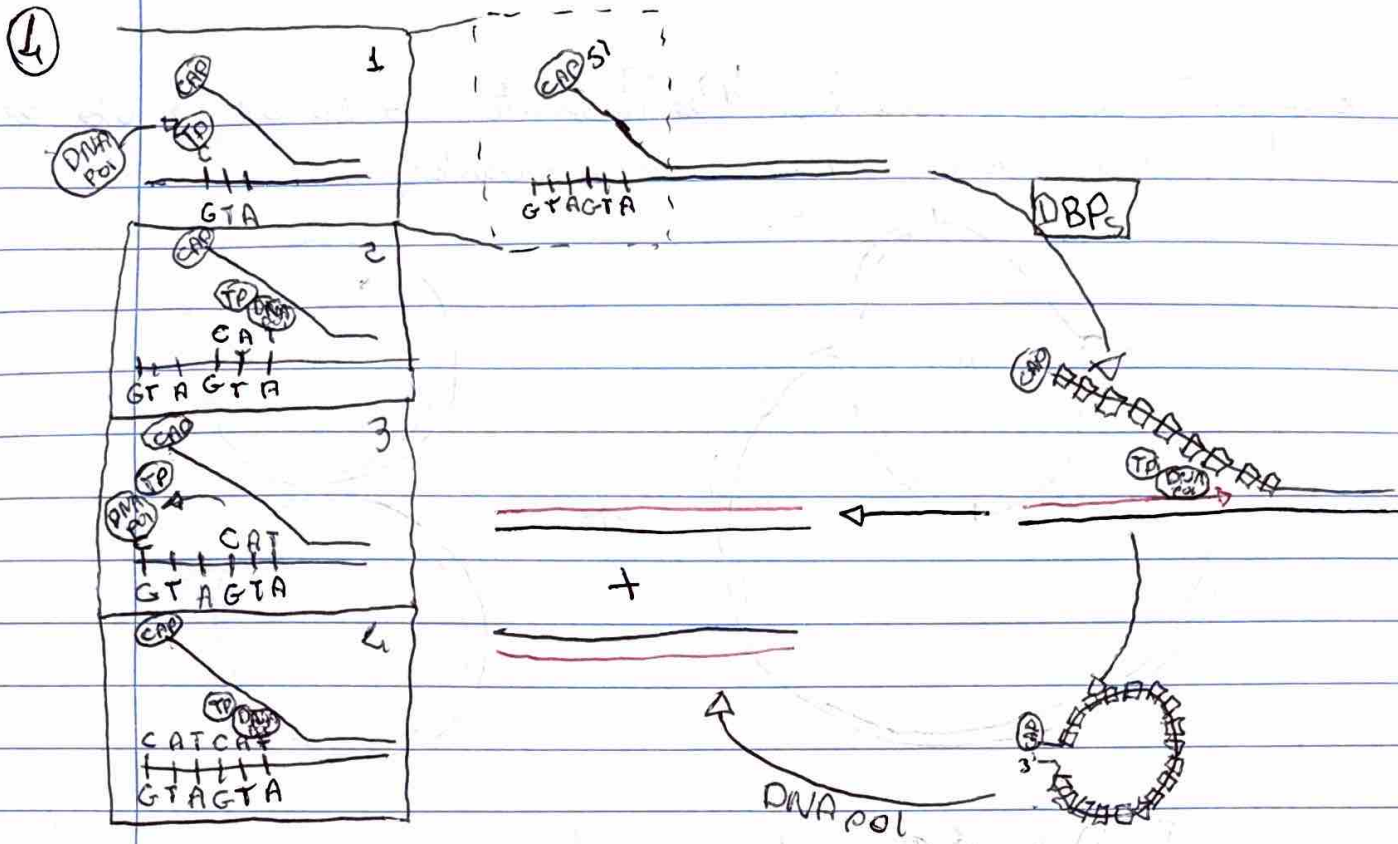
- Replicação de vírus com DNA dupla fita circular. Corre, por exemplo, com a replicação do SV-40, que possui um genoma nesse formato. Sua replicação começa com o desenrolamento da dupla fita na região de origem de replicação. A partir de então, um primer de RNA se anela na Ori e a DNA polimerase começa a síntese da fita ~~contínua~~ contínua ~~nas~~ nas fitas senso e anti-senso, formando uma forquilha de replicação. As fitas descontínuas são formadas de acordo com o

(3)

aumento da forquilha. Portanto, no final serão geradas duas cópias semi-conservadas.



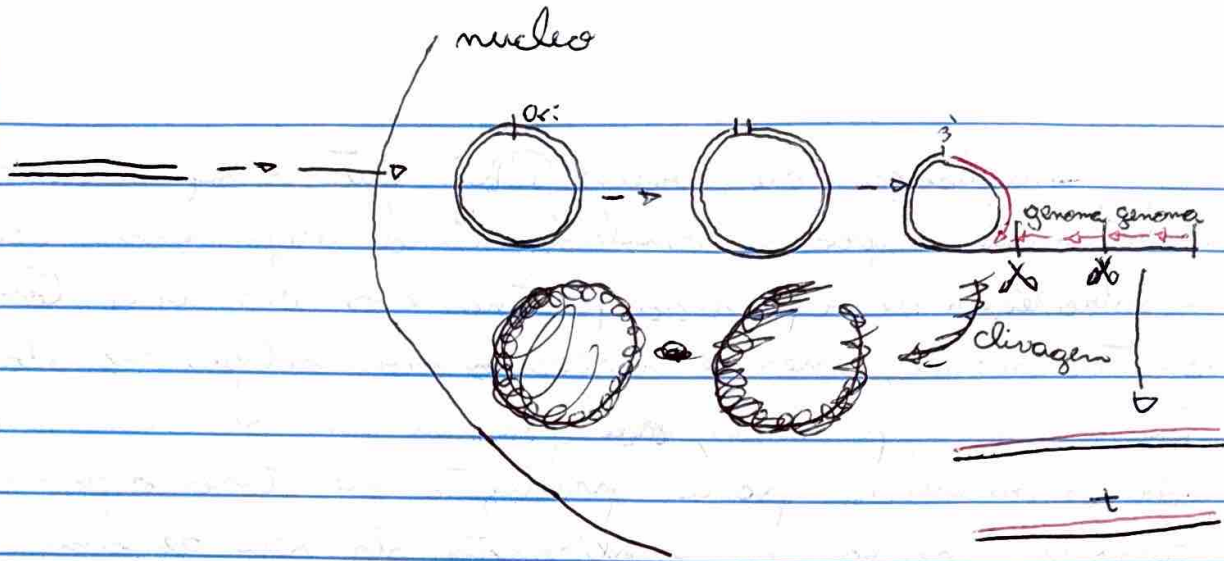
- DNA dupla fita linear: um exemplo desse caso é a replicação dos adenovírus. Esses possuem um DNA dupla fita linearizado. No começo da sua replicação, a proteína viral TP (terminal protein) liga-se ao terminal do genoma viral. TP carrega consigo uma citidina (C). Então ~~o DNA~~ essa ligação leva a um desenrolamento na região terminal, onde fica o Ori, possibilitando o acoplamento da DNA pol viral, que reconhece a TP como primer, adicionando a C à nova fita e, posteriormente, A e T. Adicionados esses três nucleotídeos, a DNA pol escorrega para o início da fita para catalisar a síntese completa da nova fita. A fita deslocada é coberta pelas DNA binding proteins (DBPs), que impede o seu anelamento. Assim, essa fita é circularizada através da interação dos seus dois terminais. Essa circularização permite o reconhecimento da DNA pol para a síntese de uma fita complementar a fita molde. Esquema na próxima página.



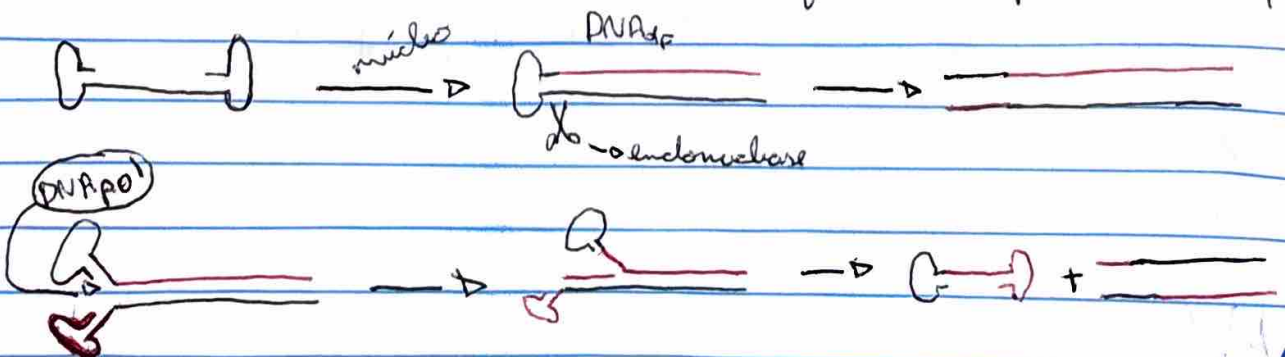
-DNA dupla fita que circulariza no núcleo:

Esse é o caso nos herpesvírus, que possuem um genoma DNA fita dupla linear, mas que ao ser transportado para o núcleo da célula hospedeira é circularizado por uma DNA ligase celular. Sua replicação ocorre pelo método círculo rolante. Uma endonuclease celular faz um corte em uma das fitas na Ori. DNA pol viral reconhece essa região e começa a realizar a síntese da nova molécula de DNA utilizando a fita íntegra como molde, enquanto uma fita descontínua é produzida a partir da fita que está sendo deslocada. Nesse modo, são formadas duas cópias ~~descontínuas~~ semi-conservadas do genoma viral. Esse genoma é produzido em concatêmeros, ou longas moléculas de DNA contendo diversos genomas virais em sequência, que serão liberados para sua incorporação na partícula viral. Exemplo na próxima página.

5



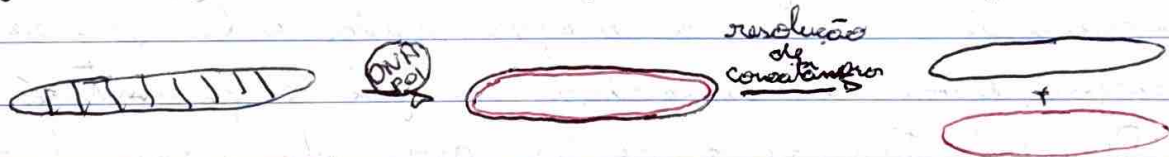
- DNA linear com terminais em hairpin: Um exemplo desse tipo de replicação ocorre com os parvovírus. As extremidades do genoma DNA fita simples linear desses vírus formam hairpins (grupos), que, ao entrarem no núcleo da célula hospedeira, serão reconhecidos pela DNA pol celular ~~proteída~~, que reconhece o hairpin como primer e iniciará a síntese de uma fita complementar formando um DNA de dupla fita. Uma endonuclease irá cortar a região oposta a Ori, na região do hairpin, isso irá linearizar a fita e permitirá que a DNA pol termine a síntese, gerando uma dupla fita semi-conservada. Então, os terminais formam novos hairpins, dando início a uma nova síntese, deslocando uma das fitas. O produto dessa reação serão uma molécula de fita simples com hairpins em ambos os terminais e uma molécula de fita dupla. Exemplo:



MLL

6

- Replicação de vírus DNA fita simples ~~co~~ ~~o~~ co-
valentemente ligado e anelado: Essa organização genômica
e estratégia de replicação pertence aos poxvírus. Como dito
anteriormente, eles se replicam no citoplasma da célula
hospedeira e, portanto, ~~se~~ possuem em seu genoma o
código necessário para produção de todo aparato ne-
cessário para a replicação do seu genoma. Seu
genoma é DNA fita simples circular anelado (dando a ~~esse~~
~~processo~~ impressão de ser dupla fita) e sua replicação
é simples. O DNA pol viral reconhece o Ori e começa
a produzir uma fita complementar a partir da fita
molde. Uma vez pronta a síntese existe uma resolu-
ção de concatâmeros para separar as fitas através da
ação de topoisomerases virais, isso dará origem a uma
fita original e uma fita nova. Exemplo:



mm

7

8

~~Antivirais e mecanismos de resistência~~

6 - Antivirais e mecanismos de resistência

Antivirais são compostos criados com o intuito de impedir a replicação viral. Devido a natureza de parasita ~~do~~ intra-celular obrigatório dos vírus, existe uma grande dificuldade na descoberta/design de novos antivirais, uma vez que a replicação viral corrrompe & diversos maquinarias celulares em prol da produção de novos vírus e, portanto, os antivirais acabam atingindo também a célula hospedeira, ou o organismo em geral, ~~que~~ o que levará a efeitos colaterais indesejados.

Durante o processo de desenvolvimento de um antiviral existem algumas barreiras que podem atrasar ou inviabilizar sua produção. Uma delas é o fato de que nem todos os vírus possuem uma célula ou animal modelo de replicação viral para crescer vírus e testá-los frente à droga sintetizada. Para resolver isso, muitas vezes é necessária a produção de animais transgênicos ou produção de organóides, o que aumenta muito os custos de desenvolvimento.

Alinda, os antivirais precisam passar por rigorosos testes a fim de elucidar sua eficácia, meia-vida, disponibilidade no tecido alvo, ~~de~~ ~~resposta~~ e condições de armazenamento e transporte e vias de inoculação. Quanto a sua eficácia, existe a necessidade de produção de compostos altamente capazes de inibir a replicação viral, pois quanto maior a eficiência, menores são os chances do vírus se replicar e

8

avalar relacionando uma população resistente

O desenvolvimento de resistência é comandado pela taxa de erro da polimerase. (Ex: a RNA pol insere um erro a cada $10^4 \sim 10^5$ nucleotídeos adicionados e não possui capacidade revisora, ou seja, em um genoma RNA de 10Kb existe a incorporação de 10^1 a 10^2 erros por genoma; já a DNA pol possui capacidade revisora, portanto, para vírus DNA o mais importante para a variação gênica é a recombinação genética) e pelas altas taxas de replicação viral, ou seja, muitos vírus replicados e inserindo erros ou recombinações aumentam as chances da produção de partículas resistentes as drogas antivirais.

Os antivirais tem como alvo as diferentes etapas do ciclo replicativo viral como: fusão/entrada, desnudamento, síntese de mRNA, síntese de proteínas virais, integração, polimerases, proteases virais e brotamento/liberação.

- Inibidores de entrada

* **Zanamivir**: composto antiviral anti-influenza que atua inibindo os canais iônicos formados pela proteína viral M2 e impede a liberação do genoma viral.

* **Raltegravir**: composto antiviral anti-HIV. É um inibidor de entrada por interação com o co-receptor viral CCR5. Assim, o Raltegravir impede a interação de gp120 com CCR5, bloqueando a entrada da partícula viral na célula alvo.

- Inibidores de polimerase nucleotídica: atuam, em geral, como bloqueadores de cadeia de ácido nucleico por serem análogos de nucleotídeos. Sendo análogos, eles são administrados como pró-drogas, pois precisam

9

ser fosforilados ao entrarem na célula infectada.

* **Zidovudina**: ~~é~~ análogo de guanosina e interruptor de cadeia. Possui um design inteligente pois sua primeira fosforilação ocorre pela timidina quinase viral, garantindo que será ativado apenas nas células infectadas, uma ~~vez~~ ~~vez~~ vez que esse antiviral atua contra herpesvírus.

* **AZT**: análogo de timidina e interruptor de cadeia. Inicialmente desenvolvido como uma droga para câncer, foi realmente importante no final da década de 80 e início da década de 90 no combate à HIV pois a retrotranscriptase viral é capaz de adicionar essa molécula eficientemente na cadeia em produção.

- Inibidores de polimerase não nucleosídicos:

* **Zalcitabina**: atua com inibição alostérica, ao interagir com a transcriptase reversa fora do seu sítio ativo, o que leva a mudanças conformacionais na estrutura do RT que impede sua atividade de transcrição.

- Inibidor de integrase:

* **Raltegravir**: interage com o sítio ativo da integrase viral (IN) do HIV, impedindo sua atividade

- Inibidor de protease:

* **Ritonavir**: ~~altera~~ mimetiza o sítio de reconhecimento da protease viral (PR) do HIV, interagindo fisicamente com seu sítio catalítico e impedindo-a de clivar as poliproteínas virais.

MM

(10)

- Inibidores de brotamento:

* Tamiflu: molécula que mimetiza o ácido siálico e interage com a proteína viral neuraminidase (NA) do influenza. ~~Essa interação impede~~ Essa interação impede que a NA libere os ácidos siálicos presentes na superfície da célula infectada, e se poderia interagir com a proteína viral hemaglutinina (HA), o que prende o vírus que está brotando na superfície da célula infectada.

Além disso, é necessário falar de uma estratégia inovadora na utilização de antirretrovirais que é o HAART. Estratégia que une três diferentes compostos antirretrovirais, ~~com~~ com diferentes alvos, no tratamento contra a infecção por HIV. Isso diminuiu muito os casos de resistência, já que é muito mais difícil selecionar mutantes resistentes a três drogas diferentes ao mesmo tempo. Além disso, aumentou em muitos anos a expectativa de vida dos pacientes infectados por HIV e diminuiu drasticamente a progressão para Aids.

am

11

Genética e evolução dos vírus emergentes e reemergentes

Os genomas virais podem ser compostos por moléculas de DNA fito simples e fito duplo, moléculas de RNA polaridade positiva ou negativa (fito simples), moléculas de RNA fito duplo, RNA com intermediário de DNA e DNA com intermediário de RNA.

Os vírus são agentes em que podemos estudar evolução de maneira rápida e eficiente, uma vez que ao adicionar uma pressão seletiva (anticorpos, compostos antivirais, soros convalescentes), eventualmente, serão selecionados vírus resistentes em poucos ciclos replicativos.

Para entender o processo evolutivo dos vírus é necessário compreender que esses agentes são capazes de produzir uma progênie enorme (Ex: 10^{10} partículas de HIV em um único dia). Por isso, quanto mais os vírus se multiplicam, maiores são as chances de surgir uma alteração de aminoácidos que lhes conferirá vantagem evolutiva, seja frente a pressão seletiva ou a aumento de fitness replicativo. Além disso, existe a taxa de erros incorporados pelas polimerases virais, sendo que as RNA pol inserem um erro a cada $10^4 - 10^5$ Kb, ou seja, em um genoma de 10Kb, a RNA pol irá inserir de 1-10 erros para cada genoma replicado. Levando em consideração a quantidade de genomas sintetizados a cada ciclo replicativo, são produzidas milhares de combinações possíveis de genoma. Já os vírus DNA possuem uma polimerase com capacidade reprovadora, o que ~~diminui~~ diminui a quantidade de genomas possíveis,

(12)

mas essas polimerases possuem grande habilidade de realizar recombinações homólogas, aumentando a capacidade de produção de prole viral plural.

Dentro dessa percepção, desenvolveu-se o conceito de quasi-especies que ~~trata~~ trata sobre a variações genéticas ~~dentro de uma população~~ dentro de uma população viral. Dando assim, segundo esse conceito, um vírus que infecta um hospedeiro gera uma prole tão plural ao longo da infecção que pode-se afirmar que todos os vírus ali presentes possuem variações genéticas entre si, mas não suficientemente diferentes para caracterizar uma nova espécie.

Outra forma comum de evolução viral ocorre com os vírus RNA com genoma segmentado. Para esses vírus, ~~em~~ caso dois tipos diferentes infectem a mesma célula, é possível que haja um rearranjo genético entre o material genético de ambos, o que levará a origem de um novo vírus, como ocorreu em 2009 na ~~em~~ epidemia de H1N1. Nesse caso, houve um rearranjo entre vírus influenza suína, humano e de aves.

~~Os anticorpos produzidos contra uma infecção viral geralmente atacam as proteínas mais expostas da partícula viral, capsídeo ou proteínas de envelope;~~

Nesse caso, existem dois fatores de seleção para populações resistentes:

* Drift antigênico: ocorre através de mutações não-sinônimas no locus gênico responsável pelo epítipo reconhecido pelo anticorpo. Essa mutação levará a alteração de aminoácidos que irão marcar

(13)

o epítopo e esse não será mais reconhecido pelo anticorpo.

* Shift antigênico: ocorre através de recombinações homologas entre diferentes genomas. Essa recombinação pode "trocar" uma parte do genoma por outra.

mm