



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

1

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: 872005

Tópico 4: Replicação Vírus DNA.

Dentre os vírus que causam infecções e doenças em humanos, os vírus DNA como o herpesvírus, papilomavírus humano (HPV) e hepadnavírus (HBV), são associados a doenças com diversas manifestações clínicas e alguns estabelecem latência. Apesar de possuírem tamanho e estrutura genômica variável, em comum estes vírus necessitam de uma DNA polimerase viral ou celular para que seu genoma seja replicado e que gere tanto os RNAs para síntese de proteínas virais quanto cópias novas do genoma a serem incorporadas na partícula.

Devido ao fato de as DNA polimerases possuírem funções de exonuclease, os erros gerados durante a síntese de novas cópias de DNA podem ser reparados. Assim, estes vírus possuem menor taxa de mutação comparado aos vírus RNA e para a variabilidade viral, o processo de recombinação é essencial. Este pode ocorrer durante a replicação quando a DNA polimerase salta de uma fita para outra formando fita híbridas, ou quando ocorre quebra da fita de DNA e a mesma é reparada de forma ~~homóloga~~ mas homóloga gerando um genoma diferente do original.

Outro ponto em comum da replicação dos vírus DNA é a necessidade da fase S do ciclo celular para a replicação. Durante esta fase, estão disponíveis na célula todos os fatores necessários a replicação do DNA, como dNTPs, a DNA polimerase e outros fatores

2

replicativas. Assim, alguns vírus só vão infectar células que estejam ativas mitoticamente, como os parvovírus. Outros vírus codificam proteínas que induzem ou ~~preendem~~ prendem a célula na fase S e evitam a apoptose. Como exemplos, as proteínas E1A e E1B de adenovírus; E6 e E7 de ~~papilomavírus~~ papilomavírus; e antígeno T de poliomavírus. A dependência da fase S depende também do tamanho do genoma, visto que vírus que possuem genomas maiores, codificam suas DNA polimerase e alguns fatores de replicação, dependendo menos da maquinaria celular o que não ocorre nos vírus de genoma menor.

Após a ligação ao receptor e entrada na célula, o início da replicação do genoma depende de pelo menos uma proteína viral. Isso ocorre pois os vírus DNA adotam uma estratégia de controle temporal da replicação que envolve a síntese de pTms. Iniciais, que ~~controlam~~ tem funções associadas a polimerase e pTms envolvidas na replicação do genoma, além de poderem atuar como controle do ciclo celular e inibição da resposta imune. O acúmulo das pTms iniciais leva a ativação de genes intermediários (no caso de adenovírus) e tardios, que levam a síntese de proteínas estruturais para a montagem de novas partículas.

Os vírus DNA de fita simples, como os parvovírus, possuem genomas menores e grande dependência da maquinaria celular. A infecção por parvovírus só ocorre em células ativas mitoticamente ou, na presença de outros vírus DNA associados (adenovírus associado). Ao entrar no núcleo, o genoma viral será reparado a partir das regiões de hairpin presentes na extremidade do genoma e, com a formação da dupla fita de DNA, a proteína NS1 viral realiza uma divergência na dupla fita. Essa divergência servirá como primer para a ~~polimerase~~ o início da replicação, seguida da transcrição do DNA pela RNA pol II celular. A replicação é realizada pela DNA polimerase celular.

É para os genomas de fita dupla, a dependência da DNA pol celular varia entre as famílias virais. Os poliom e papilomavírus

dependem da DNA pol II celular e seu genoma é associado a histonas celulares. A replicação ^{do genoma} ocorre de forma semelhante a a duplicação do DNA celular, com o reconhecimento de uma origem de replicação, geralmente rica em AT; o recrutamento do complexo replicativo; e o relaxamento das fitas de DNA. A replicação ocorre de forma bidirecional com uma fita líder (5'-3') e a fita atrasada (lagging) de sentido 3'-5'.

No caso dos papilomavírus, a replicação inicial ocorre na camada basal do epitélio e conforme há a diferenciação celular e a presença de genes de queratina nas camadas superiores do epitélio, há a síntese dos genes tardios E6 e E7 e a produção das proteínas do capsídeo e liberação de novas partículas. Já para os poliomavírus, a infecção de células que não são capazes de gerar partículas virais infecciosas ~~mas~~ produzem as proteínas do antígeno T, ~~que~~ está associada a formação de tumores.

Os adenovírus, orthoherpesvírus e poxvírus também possuem dupla fita de DNA porém, codificam sua própria DNA polimerase e alguns fatores de replicação. No caso dos poxvírus, como o mfox e o vírus vaccinia, a replicação ocorre integralmente no citoplasma ao contrário dos outros. Assim, ^{do genoma} destes vírus codificam além da DNA pol, a própria RNA polimerase e há a formação de regiões de ~~replicação~~ replicação próximas ao retículo denominadas fábricas virais.

Para os orthoherpesvírus, ao entrar no núcleo o DNA ~~se~~ circulariza-se e a replicação ocorre por círculo rolante. A proteína TP, que se encontra associada as extremidades do genoma ~~se~~ atua como primer.

Os ~~vírus~~ hepadnavírus, vírus da hepatite B (HBV) são vírus DNA que adotam uma estratégia única de replicação. Eles codificam a sua polimerase pois a mesma é uma transcriptase reversa, que utiliza o RNA como molde para a síntese de DNA. Além disso, o genoma viral é uma fita parcialmente dupla de DNA e, ao entrar no núcleo é circularizada, formando um círculo

4) Covalentemente fechado (cccDNA) que será ~~trans~~ transcrita formando o RNA mensageiro viral que pode ser traduzido ou, ser incorporado em cápsides pré-formadas originando o RNA pré-genômico (pg RNA). Este pg RNA será retrotranscrito e a fita negativa de DNA será sintetizada a partir de um primer RNA e de forma completa enquanto a fita de ~~fit~~ positiva será sintetizada parcialmente e usando a proteína TP como primer. O cccDNA pode, por estímulos celulares, se manter de forma episomal na célula, levando ao estabelecimento de latência.

Conforme mencionado, a alteração do ciclo celular induzida por algumas proteínas virais tem como principal alvo duas proteínas celulares que atuam no controle do ciclo; indução da fase S; apoptose e resposta ao dano de DNA: As proteínas p53 e pRb (retinoblastoma). Em ambos os casos, a regulação pode levar à formação de tumores e câncer, como o induzido por alguns HPVs (útero; ânus; pênis); hepatocarcinoma (HBV) e carcinoma de Merkel.

tópico 6: antivirais e mecanismos de resistência.

Para que a replicação viral ocorra, são necessárias etapas sequenciais de entrada na célula hospedeira; síntese de proteínas virais e novos genomas; montagem e liberação de novas partículas. Cada etapa depende da interação entre proteínas virais e celulares e pode levar ao estabelecimento de uma infecção que pode resultar em doença no hospedeiro.

Muitas medidas de prevenção e controle das viroses humanas é são ineficientes, mesmo para vírus que possuem vacina. No caso do sarampo por exemplo, flutuações na cobertura vacinal podem levar à infecções em indivíduos susceptíveis. Assim, os humanos são constantemente expostos a vírus já conhecidos, que emergem em determinadas períodos, e a novos vírus que são introduzidos na população.

Assim são necessárias formas de ~~ser~~ interromper uma ou mais etapas do ciclo replicativo visando reduzir ou eliminar a produção de novas partículas infecciosas, o que resulta na redução da morbidade e mortalidade associadas a viroses humanas.

O uso de antivirais atua neste sentido e a maioria dos fármacos atua em proteínas virais, impedindo sua função durante o ciclo replicativo (ação direta). Alguns fármacos também possuem ação indireta, não atuando em proteínas virais, mas auxiliando ao sistema imune no combate ao agente viral. Os fármacos que atuam no hospedeiro, são em menor número e seu uso limitado devido ao potencial de toxicidade; efeitos adversos e alterações do metabolismo celular.

Os fármacos antivirais podem atuar nas etapas de:

1) entrada \Rightarrow atuam inibindo a ligação do coreceptor a proteína de superfície viral, como o Maraviroc, utilizado contra o HIV. O fármaco é um peptídomimético e, ao se ligar ao ~~o~~ molécula de CCR5 que é um coreceptor da glicoproteína viral, impede a entrada do vírus na célula. Porém, o HIV também pode utilizar o coreceptor CXCR4 para entrada e assim um paciente que possua uma população viral

6

de vírus CXCR4 ou com afinidade por ambos os receptores mas é beneficiado pelo medicamento.

Para o HIV outro fármaco, o T20, atua na etapa de entrada porém, seu mecanismo envolve a ligação à porção HR1 da p1m gp41. Esta é a porção transmembrana da gp120 e necessária para a fusão do envelope viral à membrana celular. A ligação do fármaco à HR1 impede que esta se ligue a HR2 e altere a gp41 conformacionalmente, inibindo a fusão.

No caso do vírus influenza, a amantadina e seus derivados atuam impedindo a etapa seguinte a entrada. O vírus entra na célula por endocitose e, no endossomo, a p1m viral M2 importa prótons p1 o interior da partícula viral. Esse processo permite a liberação do genoma no núcleo e início da replicação. O fármaco se liga à M2, impedindo sua função e consequente liberação do genoma.

2) síntese \Rightarrow as polimerases virais sintetizam novas fitas de DNA ou RNA tendo os dNTPs celulares como as moléculas construtoras das novas cadeias. ~~Os dNTPs possuem uma hidroxila livre na~~

Na cadeia que está sendo sintetizada, a hidroxila livre na porção 3' do dNTP permite a incorporação de um novo nucleotídeo e a continuidade da síntese. Os inibidores análogos nucleosídicos ou nucleotídicos atuam mimetizando os dNTPs celulares e, ao serem incorporados na cadeia nascente de DNA ou RNA, levam a interrupção da síntese. Essa interrupção pode ser irreversível ou não, dependendo do fármaco utilizado. Para sua ação, os análogos precisam ser tri- ou difosforilados e esta fosforilação depende de quinases virais ou celulares. No caso do aciclovir, por exemplo, a timidina quinase viral realiza a fosforilação inicial e em seguida, quinases celulares fazem mais duas fosforilações, o que permite especificidade do fármaco a células infectadas.

Já os análogos não nucleosídicos, como o efavirenz e o sofosbuvir, atuam inibindo a atividade da polimerase através da ligação

em um bolso próximo ao sítio ativo, alterando a conformação e a processividade da proteína.*

3) inibidores de integração → atuam especificamente na etapa de integração do genoma pró-viral de retrovírus. Estes vírus possuem genoma RNA que é retrotranscrito em DNA complementar. Este DNA é então integrado ao DNA celular pela enzima integrase, que cliva o DNA celular e promove a ligação do DNA pró-viral. A enzima pode ser inibida por fármacos como o zalcitabina e didanosina impedindo a sua função e consequente transcrição e tradução do genoma viral.

4) inibidores de protease → uma das estratégias de produção das ptns. virais é a síntese de uma poliproteína, que será clivada por proteases virais e celulares dando origem aos produtos proteicos funcionais. Os inibidores de protease atuam inibindo a atividade da enzima ao se ligar no sítio ativo. Eles podem inibir a replicação de duas formas:

- para vírus RNA positivos, exceto retrovírus ⇒ a inibição da protease impede a liberação das proteínas que atuam como RNA polimerase e com isso, inibem a replicação do genoma. Ex: HCV.

- para retrovírus ⇒ a inibição da protease inibe a clivagem dos precursores gag e gag-pol, que originaram as proteínas de capsídeo e polimerase. Assim, é inibida a etapa de maturação e os vírus liberados são não infecciosos. Ex: HIV

5) inibidores de liberação ⇒ atuam inibindo a liberação dos vírus influenza ao se ligar a enzima viral neuraminidase. Esta enzima atua clivando a ligação entre a hemaglutinina presente na superfície viral e o ác. málico presente na superfície celular. Com a inibição da neuraminidase, ~~as~~ as partículas recém formadas permanecem ligadas a superfície celular e não se disseminam para novas células.

Os antivirais também podem ter atuação indireta, ou seja,

* um inibidor encontra-se descrito no fim da prova

8

mas inibir a replicação mas promover a ativação do sistema imune ou, promover o reconhecimento do agente viral. Como exemplos, o uso de interferon peguilado e imunomoduladores como no fármaco imequimod, atuam ~~atrasando~~ estimulando os genes de resposta interferon ou, receptores como o TLR7, promovendo uma resposta antiviral.

Outro mecanismo de ação indireta é o uso de anticorpos sintéticos ou, derivado de pacientes convalescentes para o tratamento de infecções causadas por vírus como o da raiva, ebola ou SARS-CoV-2. O uso de anticorpos pode facilitar a fagocitose, ativar complemento ou mesmo impedir a entrada do vírus na célula (anticorpos neutralizantes)

Apesar do vasto arsenal de fármacos que atuam em mecanismos distintos, um fator intrínseco a replicação viral limita os tratamentos: a emergência de variantes virais resistentes. Durante a replicação, as altas taxas replicativas somadas às diferentes taxas de correção de erro das polimerases virais leva a formação de vírus com genomas que carregam mutações. A presença das mutações derivadas dos erros das polimerases e dos processos de recombinação e reassortimento, levam a presença de pop. virais que carregam mutações de resistência e que, sob pressão seletiva, causada por uma infecção prolongada ou mesmo pelo uso de antivirais; podem continuar replicando mesmo na presença do fármaco.

As mutações podem fornecer vários mecanismos de resistência, tais como:

- excisão de análogos nos nucleosídeos que foram incorporados na cadeia
- preferência de incorporação de dNTPs e nos análogos nucleosídicos.
- mutações no sítio ativo de enzimas levando a não ligação

de fármacos.

→ genomas que não codificam timidina quinase e, no caso do aciclovir, não fosforilam o fármaco.

→ alterações nas proteínas que são reconhecidas por anticorpos, ~~mas~~ inibindo ou reduzindo sua eficiência de ligação.

Como alternativa para retardar a emergência de variantes resistentes, a utilização de esquemas terapêuticos que adotam duas ou mais drogas com mecanismo de ação diferente são adotados, especialmente no tratamento de infecções crônicas como HCV e HIV. Assim, mesmo vírus que desenvolvam resistência a um fármaco elas respondem a outro(s) e a replicação viral pode ser inibida.

Tópico 9: Genomas e evolução viral

A forma de disseminação dos vírus no meio ambiente é através da interação de células hospedeiras para replicação do genoma viral, produção de proteínas e montagem de novas partículas.

Assim a disseminação viral depende de interações entre proteínas virais e celulares, que acabam por coevoluir.

O genoma viral precisa codificar todas as informações necessárias para a replicação do genoma; produção e montagem de novas partículas; regulação da célula hospedeira e evasão da resposta imune. Para a grande maioria dos vírus, não há codificação de proteínas relacionadas a tradução e assim, há dependência completa da maquinaria celular. A exceção são os vírus gigantes que foram descritos a partir de 1992 com os mimi vírus, que codificam proteínas do aparato traducional como RNAs sintetases.

O genoma viral pode ser como material genético DNA ou RNA. No caso dos genomas DNA, o vírus depende de uma DNA polimerase celular ou viral para que o genoma seja transcrito.

e traduzido em proteínas bem como novos genomas sejam produzidos.

Já para os vírus RNA, há a necessidade de que o vírus codifique uma RNA polimerase RNA dependente ^(RdRp) visto que a replicação do seu genoma necessita que a polimerase sintetize RNA a partir de RNA, o que não ocorre naturalmente na célula. Nos vírus RNA polaridade positiva, a RdRp é sintetizada logo após a entrada da partícula viral na célula pois o RNA é reconhecido pela maquinaria de tradução. A exceção são os retrovírus que, apesar de terem RNA positivo, realizam retrotranscrição e assim, a polimerase precisa estar na partícula viral.

Para os vírus RNA polaridade negativa, ambisense e RNA fita dupla, a RdRp também precisa estar na partícula viral visto que o RNA não é reconhecido pela maquinaria de tradução para o início da replicação.

Independente do material genético, o genoma viral precisa ser transcrito e traduzido para produção de proteínas que irão formar uma nova partícula. Para isso, há a dependência das polimerases, que possuem diferentes capacidades de correção de erros gerados durante a replicação. A DNA polimerase possui forças de exonuclease o que permite a correção de erros gerados durante a replicação, mas incorporando-os ao genoma. Porém, a ocorrência de eventos de recombinação, seja pela troca da fita molde usada durante a replicação pela DNA polimerase; quanto pela quebra e reparo na fita podem levar a formação de genomas que diferem do original.

Já as RdRp não possuem atividade de exonuclease em sua maioria, o que faz com que erros gerados durante a ~~síntese~~ síntese de novas fitas de RNA sejam incorporados no genoma viral. A atividade das RdRp também restringe o tamanho dos genomas de vírus RNA visto que, com as

altas taxas de erro, genomas grandes não iniciáveis e não mantêm a sua integridade devido a presença de muitas mutações.

Assim, os genomas DNA possuem baixas taxas de erro, o que possibilita genomas maiores porém menos diversos comparados aos vírus RNA. Por sua vez, os genomas RNA apresentam maiores taxas de erro, genomas menores e maior variabilidade. A exceção são os coronavírus, cuja polimerase possui capacidade de correção de erros e estes vírus possuem os maiores genomas de RNA.

Os vírus RNA existem então, em um mesmo indivíduo infectado, como quasispécies virais. Estas são populações virais que não geneticamente relacionadas mas não idênticas e que coexistem fazendo com que estes vírus possuam grande diversidade intra-hospedeiro. A presença de quasispécies permite uma grande plasticidade aos vírus RNA, fazendo com que uma população viral dominante possa ser rapidamente substituída caso o ambiente seja desfavorável em um dado momento.

Dessa forma, a presença de genomas com mutações possibilita adaptações aos vírus, tais como a mudança de hospedeiros, escape à resposta imune e resistência a antivirais. Alguns exemplos da evolução viral em vírus de importância humana estão descritos abaixo:

1) Influenza ⇒ as proteínas de superfície de hemaglutinina e neuraminidase são as mais imunogênicas. No entanto, mutações nestas proteínas fazem com que elas não sejam mais reconhecidas por anticorpos vacinais ou de infecções prévias. Assim, o fenômeno de drift antigênico faz com que seja necessária a atualização anual das vacinas.

Ainda para o influenza, o fenômeno de shift antigênico promove a troca de hospedeiros e introdução de cepas com potencial pandêmico e epidêmico em humanos. Isso ocorre pois, durante a replicação do genoma segmentado destes vírus que

podem ser gerados pelo salto da RdRp ou pelo rearranjo de segmentos na montagem do vírus em células que foram infectadas por vírus diferentes, leva a formações de genomas quiméricos.

Quando estes eventos ocorrem no gene da neuraminidase, há possibilidade de troca de hospedeiros. Isso ocorre pois a neuraminidase viral cliva o ácido siálico celular em posições que variam entre espécies: a clivagem no resíduo α2,3 do ácido

siálico ligado à galactose ocorre no trato respiratório de aves e suínos e no trato respiratório inferior humano. Já a clivagem no resíduo α2,6 ocorre em suínos e no trato respiratório superior humano. Assim, vírus α2,3 que se rearranjam e passam a codificar neuraminidasas α2,6, podem saltar de aves para humanos.

2) SARS-CoV-2 ⇒ mesmo com a menor taxa de mutação, devido a capacidade de correção da RdRp, as altas taxas replicativas somada a grande circulação; pressão do sist. imune e vacinações, e a replicação em indivíduos imunocomprometidos levou a emergência de variantes virais com diferentes fenótipos.

No início da pandemia, a emergência e fixação da mutação D614G propiciou ~~uma~~ estabilidade e maior ~~na~~ infectiosidade do SARS-CoV-2 e foi seguida da emergência de ~~várias~~ diversas variantes. A proteína spike na superfície viral é a que mais sofreu mutações o que proporcionou ao vírus a capacidade de escapar da resposta imune de infecções prévias e da vacinação.

3) HIV ⇒ a infecção crônica pelo HIV leva a uma constante formação de anticorpos contra a proteína gp120 do envelope viral. No entanto, a constante replicação leva a variantes que possuem mutações na proteína de envelope que as tornam capazes de evadir da resposta imune. A terapia com anti-virais é outro fator que exerce pressão seletiva e leva a

emergência de variantes resistentes aos fármacos. Alguns polímeros naturais do HIV-2 tornam-se resistentes a todos os INTR e alguns IPr.

O cenário da evolução viral é complexo e tanto fatores virais como do hospedeiro moldam essa relação. Assim, ações humanas que podem levar a aumento à exposição à novos vírus ou, que modifiquem a interação com vírus existentes podem levar a um desbalanço e emergência ou reemergência de vírus.

Apesar da compreensão atual dos mecanismos evolutivos, a origem dos vírus ainda é um assunto de debates e que não foi elucidado. Três teorias principais ~~são~~ sobre a origem viral são:

- Teoria pré-celular: os vírus existiam antes das células, sendo parte dos replicons primordiais.
- Teoria escape celular: os vírus faziam parte da célula primitiva porém adquiriam a capacidade de codificar um capsídeo e de replicação semi-autônoma.
- Teoria da regressão celular: os vírus perderam a capacidade replicativa e retornaram a dependência da célula para replicação.

Atualmente acredita-se que uma mistura entre essas teorias tenha originado ~~estes~~ os precursores dos vírus atuais visto que os mesmos são um grupo polifilético.

— X —

Complemento do tópico 6:

- inibidor de síntese do influenza: o telmirivir bloqueia o mecanismo de sequestro de CAP dos RNAm celulares, que é realizado pela porção PA do complexo replicativo viral. Assim, os RNAm virais não são capeados e consequentemente não são traduzidos.