

Sofia Luzia Gonçalves Pereira

Moléculas Antivirais – Que futuro?



Universidade Fernando Pessoa,

Faculdade Ciências da Saúde.

Porto 2012

Sofia Luzia Gonçalves Pereira

Moléculas Antivirais – Que futuro?



Universidade Fernando Pessoa,

Faculdade Ciências da Saúde.

Porto 2012

Moléculas Antivirais – Que futuro?

Autor: Sofia Luzia Gonçalves Pereira

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Magalhães

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

Este trabalho tem como objectivo investigar e refletir sobre o futuro das moléculas antivirais, através de uma intensiva pesquisa bibliográfica e leitura de artigos científicos sobre as propriedades e desenvolvimento dos antivirais e quais os desafios que a virologia encontra no desenvolvimento de antivirais eficazes e seguros. Esta pesquisa coloca de imediato duas questões pertinentes: aperfeiçoamento de antivirais já existentes e aplicar as novas tecnologias na descoberta de novos mecanismos de ação e consequente desenvolvimento de novos fármacos.

Apesar do conhecimento adquirido nesta área ao longo de várias décadas, este tipo de fármacos continua a ser produzido numa quantidade muito inferior à que seria desejável. O défice observado poderá estar relacionado com a dificuldade que os investigadores encontram em ultrapassar as maiores limitações dos antivirais, como toxicidade, latência viral, discrepância entre fase de tratamento e diagnóstico e resistência adquirida dos vírus a estes fármacos. As dificuldades nas etapas finais desta pesquisa como os ensaios clínicos em humanos, também surgem como um obstáculo ao seu desenvolvimento. (Saxena et al., 2009).

Estando as infeções virais entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro, importa refletir sobre o futuro dos fármacos antivirais como tratamento, direccionando a atenção para os que se encontram neste momento ainda numa fase precoce de desenvolvimento e apontar estratégias no sentido de melhorar este tipo de terapia.

Abstract

This paper aims to investigate and reflect on the future of antiviral molecules, through an intensive literature search and reading of scientific articles on the properties and development of antiviral agents and what challenges virology is to develop safe and effective antiviral. This research raises two questions immediately relevant: improvement of existing antiviral agents and apply new technologies in the discovery of new mechanisms of action and consequent development of new drugs.

Despite the knowledge acquired in this area over decades, such drugs continue to be produced in an amount much lower than would be desirable. This deficit observed may be related to the difficulty that investigators are to overcome the major limitations of antiviral such as toxicity, viral latency, phase discrepancy between the treatment and diagnosis of virus and acquired resistance to these drugs. The difficulties in the final stages of this research and clinical trials in humans, also appear as an obstacle to its development (Saxena et al., 2009).

Being viral infections among the major causes of morbidity and mortality in the worldwide, it is important to reflect on the future of antiviral drugs as treatment, directing attention to those who are currently at an early stage of development and strategies to improve this type of therapy.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Ricardo Magalhães por todo o apoio, orientação científica e disponibilidade prestada durante a realização do seguinte trabalho.

Aos meus pais pelo apoio, amizade, carinho que sempre me transmitiram durante este percurso académico. Ensinaram a escolher o caminho correto na vida. Obrigada.

Ao meu irmão Rui, por toda amizade e companheirismo, sendo um exemplo de coragem para mim.

A todos os meus amigos que estiveram sempre ao meu lado, a darem força em todos os momentos.

À minha família por todo o apoio e por acreditarem em mim e no valor do meu trabalho.

Por fim quero agradecer ao João por estar sempre presente, pelo seu apoio e paciência, mas acima de tudo por me fazer feliz.

Índice

Introdução	1
Capítulo I - Introdução à virologia	3
1. O surgimento da virologia como ciência	3
2. A importância da virologia	4
3. Razões para estudar um vírus	5
4. O contributo do estudo do vírus para o conhecimento	8
Capítulo II - Vírus	9
1. O que são vírus	9
2. Estrutura de um vírus	10
3. Classificação dos vírus	12
4. Ciclo de Replicação dos vírus	15
5. Mutações dos vírus	18
6. O papel dos antivirais no ciclo de replicação do vírus	19
Capítulo III - Antivirais	21
1. Modo de ação dos antivirais e respectivos alvos	21
i. Inibidores de fusão/ adsorção	23
ii. Inibidores da descapsidação	24
iii. Inibidores da DNA Polimerase	25
iv. Inibidores da Transcriptase Reversa	29
v. Inibidores da Integrase	32
vi. Inibidores da Protéase	33
vii. Inibidores da Transmissão de Vírus	33
viii. Inibidores da Neuramidase	34

Capítulo IV - Antivirais: que futuro?	36
1. Métodos de deteção precoce de novos vírus	36
2. Limitações dos antivirais	40
3. Novos antivirais.....	43
i. Métodos de desenvolvimento dos novos antivirais	43
ii. Antivirais específicos.....	46
iii. Antivirais de largo espectro	47
Conclusão	58
Bibliografia.....	62
Anexos.....	70

Índice de Abreviaturas

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Apaf-1 - “apoptosis protease activating-factor”

ATP - “ Adenosine-5-Triphosphate” – Adenosina -5’ - trifosfato

Células NK – “ Natural Killer cell” – Células Natural Killer

CMV - “Cytomegalovirus”- Citomegalovírus

Cyt c - “Cytochrome c”- Citocromo *c*

dCTP – “ Deoxycytidine triphosphate” – Trifosfato de desoxicitidina

DNA - “Desoxiribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico

DRACO - “Double-stranded RNA Activated Caspase Oligomerizer

dsDNA – “ Double- Stranded DNA ”- DNA de cadeia Dupla

dsRNA-RT – “Double-Stranded RNA –Reverse Transcription” – RNA de cadeia dupla- com Transcrição reversa

FDA - “Food and Drug Administration”- Administração de alimentos e medicamentos

GP 41 – Glicoproteína

GTP – “ Guanosine 5`-triphosphate” - guanosina 5’ - trifosfato

H5N1- Hemaglutinina 5, Neuraminidase 1

HBV- “Hepatitis B Virus”- Vírus da Hepatite B

HIV-1 – “Human Immunodeficiency Virus” – Virus da Imunodeficiência Humana

HPMPS – Hidroxifosfonilmetoxipropilcitosina

HPV – Vírus Papiloma Humano

HSV – “ Herpes Simplex Virus” – Vírus Herpes simplex

ICTV- “International Committee on Taxonomy of Viruses” - Comité Internacional de Taxonomía de Vírus

IP – Inibidores da Protéase

mRNA – RNA mensageiro

NNRTI - “Non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitors” - Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa

NRTI- “Nucleoside reverse transcriptase inhibitors” – Análogos nucleosídeos Inibidores da transcriptase reversa

ntRTI –“ Nucleotide reverse transcriptase inhibitors” – Análogos nucleotídeos Inibidores da transcriptase reversa de

PCD - “Programmed cell death”- Morte celular programada

PKR- “Protein Kinase R” – Proteína quinase R

RNA - “Ribonucleic acid” - Ácido ribonucleico

ssDNA – “Single-Stranded DNA”- DNA de cadeia Simples

SV40 – “Simian Virus 40”- Vírus Simian 40

T-20 - Enfuvirtide

TK- “Timidina kinase”-Timidina quinase

TR – Transcriptase Reversa

UL97 – Gene UL-97

VHS – “ Viral Hemorrhagic septicemia”- Septicemia Hemorrágica viral

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VVZ- “ Virus Varicella Zoster ”- Vírus Varicela Zoster

Índice de Figuras

Figura 1 – Doente infetada com o vírus Variola	5
Figura 2 – Febre aftosa	6
Figura 3 – Fago ampliado 250 000 vezes	6
Figura 4 – Estrutura do vírus Influenza.....	10
Figura 5 – Cápside de Simetria Helicoidal.....	11
Figura 6 – Cápside de Simetria Icosaédrica	11
Figura 7 – Classificação de Baltimore.....	14
Figura 8 – Exemplificação do Ciclo da Replicação do Vírus	18
Figura 9 – Descrição dos principais alvos e respetivos antivirais	22
Figura 10 – Estrutura da Enfuvirtida	23
Figura 11 – Estrutura da Amantadina.....	24
Figura 12 – Molécula do Aciclovir	25
Figura 13 – Estrutura do Ganciclovir	26
Figura 14 – Estrutura do Foscanet.....	28
Figura 15 – Estrutura do Cidofovir	28
Figura 16 – Estrutura do Zidovudina.....	29
Figura 17 – Estrutura do Lamivulina.....	30
Figura 18 – Estrutura do Nevirapina	31
Figura 19 – Estrutura do Adefovir.....	31
Figura 20 – Estrutura do Raltegravir	32
Figura 21 – Estrutura do Ritonavir	33
Figura 22 – Molécula de Ribavirina.....	34
Figura 23 – Molécula do Zanamivir	35
Figura 24 – Molécula do Oseltamivir.....	35
Figura 25 – Imagem Microscópica do vírus SARS	37

Figura 26 – Zoonoses são fonte de novos vírus	38
Figura 27 – Modelo de dados de Raio X (sitio ativo de uma HIV integrasse).....	44
Figura 28 - Draco	50
Figura 29 – Via do Interferão	54
Figura 30 – Imagens microscópicas que demonstram a eficácia do DRACO contra o Rinovírus e Dengue	55
Figura 31 – Antiviral de Largo Espectro: LJ001	56

Índice de tabelas

Tabela 1 – Novos antivirais contra o Citomegalovírus	47
Tabela 2 – Vírus utilizados para testar a eficácia do Draco	51
Tabela 3 – Células utilizadas no estudo (Draco)	52
Tabela 4 – LJ001: Capacidade de inibição sobre vírus com e sem invólucro	57

Introdução

Os vírus infetam todas as formas celulares de vida, desde os eucariotas (animais vertebrados, invertebrados, plantas e fungos) aos procariotas (bactérias e archaea), chegando mesmo a perturbar o ciclo viral de outros vírus (Flint et al., 2009).

Um dos primeiros registos foi de uma infeção vírica de que há conhecimento terá sido encontrado num hieróglifo proveniente da capital do Antigo Egito, Memphis, datada de 3700 a.C. Nele, retratava-se um sacerdote que aparentava, segundo a descrição, aquilo que hoje em dia sabemos ser poliomielite (Cann, 2005).

Assim, e ao longo de vários séculos, surgiram várias tentativas no sentido de perceber a origem destas doenças para as quais não se tinha encontrado ainda qualquer tipo de cura (Enquist, 2009).

O vírus, como agente submicroscópico, só pode ser visualizado através de microscopia eletrónica, pois o seu tamanho varia na ordem de nanómetros (na escala de milionésimos de milímetros). O surgimento do primeiro microscópico eletrónico data os anos 1930 e foi um marco importante na historia da virologia, pois foi a partir desta descoberta que já foi possível confirmar a dimensão submicroscópica do vírus, ao mesmo tempo que foi possível fazer uma classificação racional do vírus (Flint et al., 2009).

Ao longo do tempo foram estudadas e elaboradas diretrizes para compreender o mecanismo os vírus e assim ser possível de identificar quais as formas de prevenção de determinada doença causada por vírus, como também desenvolver fármacos capazes de controlar a infeção causada por este (Blair et al., 1998).

Ainda que a definição mais básica que podemos encontrar sobre vírus é: “ Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, de dimensões submicroscópicas” (Carter e Saunders, 2007). Esta definição permite-nos compreender algo de importante no funcionamento dos mesmos que é a necessidade da existência de um hospedeiro para realizar a sua função de replicação.

Assim, para que haja replicação do vírus, é necessário que este entre na célula pela transposição da membrana celular. A membrana celular é uma barreira física da própria célula.

Quando dentro da célula, o vírus precisa replicar o seu ácido nucleico, e para isso usa parte da maquinaria que é sintetizada pela célula hospedeira. Depois, o ácido nucleico e as proteínas virais são transportados na célula para locais de montagem, onde se dá a formação de uma nova progénie de partículas virais infetantes, que são finamente liberadas para fora da célula” (Simoni, 2003; Luria, 1978).

A crescente incidência de patologias provocadas pelo vírus fizera com que houvesse a necessidade de estudo e de desenvolvimento de fármacos. O objectivo destes químicos é atuar nas diferentes etapas da replicação do vírus, o que fará com que haja uma inibição da replicação (Clercq, 2004).

Idealmente, este tipo de antivirais não deve interferir nos mecanismos de defesa da célula contra a infeção, mas sim complementar a imunidade e a resposta humoral de anticorpos para deter a reprodução viral (Flint et al., 2009).

Embora muitos dos vírus tenham já sido descobertos, novos vírus continuam a surgir exigindo um aprofundamento cada vez maior acerca da sua forma de funcionamento, contribuindo assim para o estudo da síntese de fármacos cada vez mais eficazes, quer nos vírus já conhecidos, quer nos que ainda possam surgir (Simoni, 2003).

A virologia encontra pela frente um grande desafio, por vários motivos:

- Constante aparecimento de novos vírus, bem como a variabilidade genética inerente de muitos vírus já conhecidos;
- Os alvos disponíveis são reduzidos, uma vez que existe uma estreita relação entre o vírus e a célula hospedeira, o que dificulta a tarefa de encontrar um antiviral que não afete a célula hospedeira

Capítulo I - Introdução à virologia

1. O surgimento da virologia como ciência

O primeiro registo de uma infeção vírica de que há conhecimento terá sido encontrado num hieróglifo proveniente da capital do Antigo Egito, Memphis, datada de 3700 a.C. Nele, retratava-se um sacerdote que aparentava, segundo a descrição, aquilo que hoje em dia sabemos ser poliomielite (Cann, 2005).

Este registo leva-nos a perceber a importância das infeções víricas para as civilizações mais longínquas, percorrendo e afetando várias das Antigas Civilizações.

Assim, e ao longo de vários séculos, surgiram várias tentativas no sentido de perceber a origem destas doenças que limitavam de forma marcante a evolução das sociedades (Enquist, 2009).

Em 1880 Robert Kock e Louis Pasteur propuseram a “teoria dos germes”, escrevendo postulados que, segundo eles, permitiam a identificação de agentes infecciosos, caso estes postulados fossem verificados. No entanto, Pasteur não foi capaz de distinguir bactérias de outros agentes causadores de doenças (Flint *et al.*, 2009).

Foi em 1892 que Dmitri Ivanovsky, um botânico russo, mostrou que extrato de plantas de tabaco infetadas podiam contaminar outras plantas, após passagem por filtros de porcelana suficientemente finos para reter as bactérias mais pequenas conhecidas até então. Dmitri descobre assim a doença do mosaico do tabaco, cujo agente causador, não era retido pelos filtros. No entanto, não entendeu na totalidade o significado destes resultados (Ferreira e Sousa, 1998)

Em 1930 V. Zworin, inventa o microscópio eletrónico revolucionando a virologia, confirmando a dimensão submicroscópica dos vírus (de 20 nm a 600 nm) (Flint *et al.*, 2009).

O surgimento da bioquímica viral, dos anos 30 aos anos 50, veio confirmar a constituição dos vírus por ácido nucleico, portador de informação genética sob a forma de RNA nus e de DNA nus (Flint *et al.*, 2009).

De uma maneira geral, nos anos 30 e décadas subsequentes, virologistas pioneiros como Salvador Luria, Max Delbruck e outros, usaram vírus bacteriófagos como modelos para investigar muitos aspectos da virologia, incluindo a sua estrutura, genética e replicação. A restante história da virologia baseia-se essencialmente no desenvolvimento de técnicas experimentais e sistemas nos quais os vírus possam ser estudados, bem como as células hospedeiras, cujo papel irá ser abordado posteriormente.

Os estudos realizados pela virologia no sentido do conhecimento do metabolismo viral permitiram saber em que situações os vírus utilizam as suas próprias enzimas no seu ciclo de replicação. A partir daqui tornou-se então possível tentar desenvolver fármacos que inibissem as proteínas virais especificamente. (Murray *et al.*, 2009).

2. A importância da virologia

A Virologia é uma ciência que estuda os vírus, está contudo tradicionalmente incluída na Microbiologia pois esta disciplina detém o seu foco de estudo sobre os seres vivos de dimensões microscópicas. A virologia tem extrema importância para a humanidade, uma vez que os vírus são ameaças à saúde humana. Como grandes ameaças identificamos, por exemplo, o VIH, Hepatite B. Papiloma vírus, Sarampo e Gripe, entre outros (Flint *et al.*, 2009).

Os vírus afetam todas as formas da vida celular: eucariontes (animais vertebrados, animais invertebrados, plantas, fungos) e procariontes (bactérias e archaea). É óbvia a presença de vírus em organismos hospedeiros que apresentam sinais de doença. No entanto, muitos organismos saudáveis são hospedeiros de infeções não-patogénicas, alguns dos quais estão ativos, enquanto alguns são quiescentes. Além disso, os vírus também podem ser encontrados no ar, solo e água (Flint *et al.*, 2009).

A nossa espécie é o objeto de estudo que detém maior atenção para a virologia, pois é de todo o nosso interesse perceber mais sobre os agentes e processos que afetam a nossa saúde.

Existe uma forte correlação entre a intensidade com que é encontrado um vírus numa espécie e a o estudo que é feito sobre essa mesma espécie. Por isso, não é novidade nenhuma que o número de vírus humanos estudados seja maior que vírus que afetam qualquer outra espécie. Novos vírus humanos são encontrados continuamente.

Sem dúvida que os vírus encontrados até hoje representam uma pequena fração dos vírus que existem na terra. A presença de vírus, assim como potenciais hospedeiros têm ainda que ser estudados em muitas plantas, animais, fungos e bactérias, pois muitos continuam por descobrir (Flint *et al.*, 2009).

Além disso, a análise do DNA a partir de ambientes naturais apontam para a existência de muitas espécies de bactérias que ainda não foram isoladas em laboratório. É provável que estas bactérias também sejam hospedeiras de vírus (Cann, 2005).

3. Razões para estudar os vírus

Os vírus por provocarem doenças infecciosas afetam o bem-estar da sociedade. Os vírus provocam doenças que podem ir desde a simples constipação até doenças letais, como a raiva, por exemplo, ou a varíola que teve grande impacto no passado, ou até mesmo o VIH que continua a ter grande importância nos dias de hoje (Carter e Saunders, 2007).



Figura 1-Doente infetada com o vírus varíola. Retirado de OMS adia destruição do vírus da varíola. Em linha. Disponível em <http://www.bbc.co.uk/portuguese/ciencia/020518_variolae.shtml> [Consultado em Setembro de 2012]

É portanto, de extrema importância que se estudem os vírus, para que se compreenda a sua natureza, como eles se reproduzem e como causam as doenças. É através deste conhecimento que é possível desenvolver métodos eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento, bem como medicamentos antivirais. Estas aplicações técnicas constituem, portanto, os principais aspetos da ciência da virologia (Carter e Saunders, 2007; Flint *et al.*, 2009).

A virologia veterinária e a virologia vegetal são igualmente importantes devido ao impacto económico dos muitos vírus que causam doenças em animais e plantas. Podemos identificar a febre aftosa e o vírus do arroz moodle (Flint *et al.*, 2009; Field *et al.*, 2011).



Figura 2- Febre aftosa. Retirado de Vegana animais. Em linha. Disponível em <<http://veganaporamoraosanimais.blog.terra.com.br/2011/09/20/febre/>> [Consultado em Setembro 2012].

Os vírus poderão igualmente causar danos económicos na indústria alimentar, pois os fagos podem infetar as bactérias lácticas que são responsáveis pela fermentação do ácido láctico. O ácido láctico é usado: na indústria alimentícia para produção (queijos, iogurtes, em síntese orgânicas na fabricação de tintas, vernizes, polímeros, entre outros (Carter e Saunders, 2007).



Figura 3- Fago ampliado 250.000 vezes. Retirado de Cientista Em linha. Disponível em <http://isaninhacientista-minicientista.blogspot.pt/2012_04_01_archive.html> [Consultado em Setembro 2012].

O estudo dos vírus tem ainda outras aplicações, tais como:

- a) Fagotipagem de bactérias: alguns tipos de bactérias como a Salmonela são classificadas como estirpes com base no espectro de fagos. A identificação deste tipo de fagos isolados pode fornecer-nos informações epidemiológicas úteis durante surtos causados por este tipo de vírus (Carter e Saunders, 2007).
- b) Identificação das fontes de enzimas, pois uma parte das enzimas usadas em biologia são enzimas virais, como por exemplo polimerases de RNA a partir de fagos (Carter e Saunders, 2007).
- c) Pesticidas: Os vírus são igualmente usado para controlar pragas. O vírus mixoma, por exemplo, foi usado para controlar pragas de coelhos (Carter e Saunders, 2007).
- d) Agentes anti bacterianos: inicialmente, no século XX, os fagos foram utilizados para o tratamento de algumas infeções bacterianas nos humanos. Esta técnica entrou em desuso com a descoberta de antibióticos. No entanto, esta técnica foi retomada com o surgimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos (Carter e Saunders, 2007).
- e) Agentes anticancerígenos: algumas estirpes de vírus geneticamente modificados estão a ser estudados para o tratamento de cancro, tais como o vírus do herpes simplex e o vírus *vaccinia*. Estas estirpes foram modificadas de modo a serem capazes de infetar e destruir as células tumorais, mas são incapazes de infetar as células “normais” (Carter e Saunders, 2007).
- f) Vetores de genes para a produção de proteína: alguns vírus são utilizados como vetores para transferir genes para células animais em cultura. Esta tecnologia pode ser utilizada para a produção de proteínas em massa. Como exemplo deste vírus temos o adenovírus (Carter e Saunders, 2007).
- g) Vetores de genes para o tratamento de doenças genéticas: crianças com imunodeficiência genética combinada grave foram tratadas com sucesso com a utilização de retrovírus como vetores para introduzir nas suas células estaminais uma cópia não modificada do gene responsável por essa doença (Carter e Saunders, 2007).

4. Contributo do estudo de vírus para o desenvolvimento científico

Carter e Saunders (2007) referiram que muito do conhecimento básico de biologia molecular, biologia celular e cancro derivaram de estudos sobre vírus. Ao longo deste ponto destacamos alguns exemplos:

- a) Foi através de uma experiência realizada em 1952 por Alfred Hershey e Chase Martha, onde foi usado o fago T2 e *E. coli*, que foram fornecidas fortes evidências de que os genes são compostos por DNA.
- b) Os primeiros promotores a serem caracterizados estavam em genes do vírus Simio 40 (SV40).
- c) O primeiro fator de transcrição a ser caracterizado foi o transplante de antígeno (T) de SV40.
- d) O primeiro sinal de localização nuclear de uma proteína foi identificado no antígeno (T) do SV40.
- e) Os Intrões foram descobertos durante os ensaios de transcrição do adenovírus.
- f) O papel da estrutura da extremidade 5 do mensageiro eucariótico de RNA foi descoberto durante os estudos do vírus vaccinia e de um reovírus.
- g) A primeira entrada interna ribossomal a ser descoberta foi encontrada no RNA do poliovírus.

Capítulo II - Vírus

1. O que são Vírus

Tal como foi referido no capítulo anterior, os vírus são alvo de estudo por parte de virologistas, pois é de extrema importância o entendimento de como afeta, não só o homem mas também todo o ecossistema que nos envolve.

Deste modo, será relevante, antes de entender o modo de funcionamento de um vírus, descrever a sua estrutura.

A definição mais básica que podemos encontrar sobre vírus é: “ Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, de dimensões submicroscópicas” (Cann, 2005).

Esta definição fica por isso muito aquém não nos permitindo diferenciar os vírus de outros grupos de organismos vivos de carácter patogénico, nomeadamente algumas bactérias, igualmente parasitas intracelulares, mesmo que por um curto período de tempo.

Segundo Carter e Saunders (2007), o desenvolvimento do conhecimento da estrutura das partículas víricas e os mecanismos pelos quais se reproduzem nas células hospedeiras, permitiram formular definições mais precisas que compreendem:

- O vírus é um parasita intracelular obrigatório, de carácter infeccioso.
- O genoma viral contém DNA e/ou RNA.
- Dentro da célula hospedeira apropriada, o genoma viral controla a síntese de todos os componentes virais, elaborada pelos sistemas celulares.
- Os viriões, partículas infecciosas provenientes do vírus, são formados a partir dos novos componentes, sintetizados no interior da célula.
- O virião formado durante o ciclo de infeção é o veículo de transmissão do genoma viral para a próxima célula hospedeira, iniciando um novo ciclo.

Os vírus são, na sua generalidade muito simples, dependendo dos seus hospedeiros para as suas necessidades, incluindo componentes essenciais como aminoácidos e nucleosídeos, maquinaria capaz de sintetizar proteína (ribossomas) e energia na forma de ATP.

É possível então, e de acordo com Carter e Saunders (2007), concluir que os vírus se comportam como partículas “vivas” dentro da célula hospedeira, mas no exterior desta não passam de montagens complexas de químicos metabolicamente inertes.

2. Estrutura de um vírus

Um virião é um sistema de entrega de genes, isto é, o virião contém o genoma do vírus e a sua função é proteger o genoma e ajudar à entrega deste na célula, onde se poderá replicar e agrupar-se em novos viriões (Flint *et al.*, 2009).

Assim, a constituição básica de um virião é composta por um nucleóide onde se encontra o ácido nucleico viral (DNA ou RNA) associado a proteínas e uma estrutura de proteção proteica denominada cápside. As unidades constituintes da cápside denominam-se capsómeros. No seu conjunto, o nucleóide e a cápside denominam-se nucleocápside (Cann, 2005; Ferreira e Sousa, 1998).

Alguns vírus contêm ainda um componente lipídico, geralmente presente na superfície do virião formando um invólucro (o qual também contém proteínas), cuja finalidade é facilitar a entrada na célula hospedeira. Tal é o caso do HIV e do HSV (Cann, 2005).

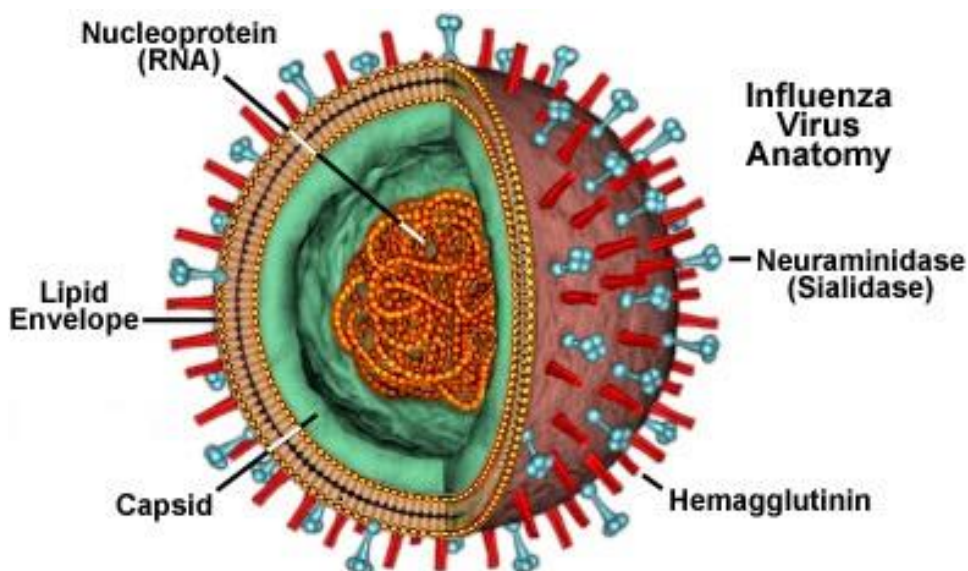


Figura 4- Estrutura do Vírus Influenza. Retirado de The Influenza Virus. Em linha. Disponível em <<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

A cápside tem uma elevada importância na replicação do vírus, uma vez que a sua função compreende a proteção do genoma viral e o reconhecimento e ligação à célula hospedeira (Ferreira e Sousa, 1998).

Apesar da cápside ter de ser suficientemente estável para sobreviver num ambiente extracelular, também deverá ter a capacidade de alterar a sua conformação para que no momento apropriado possa libertar o genoma na célula hospedeira (Flint *et al.*, 2009).

A cápside pode assim apresentar 2 tipos de simetria: helicoidal e icosaédrica. A simetria helicoidal é característica de muitos vírus contendo RNA. O RNA encontra-se enrolado sob a forma de uma hélice e várias cópias da mesma proteína encontram-se distribuídas ao longo do tubo, formando uma estrutura alongada (Ferreira e Sousa, 1998).

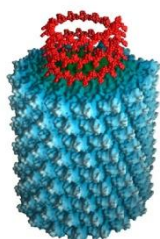


Figura 5- Cápside de simetria helicoidal. Retirado de Los Virus. Em linha. Disponível em <<http://b-log-ia20.blogspot.pt/2009/05/los-virus.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

Na simetria icosaédrica as cápsides adquirem a forma de uma concha, constituída a partir de moléculas de proteína que parecem ter sido organizadas de modo a formar um icosaedro. Neste tipo de simetria as proteínas têm menor contacto com o genoma do vírus do que as proteínas de uma cápside helicoidal. Os capsômeros organizam-se em icosaedros (Flint *et al.*, 2009; Ferreira e Sousa, 1998).

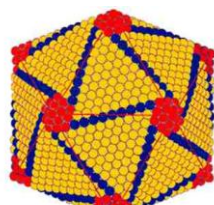


Figura 6- Cápside de simetria icosaédrica. Retirado de Propriedades gerais dos vírus. Em linha. Disponível em <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/virus/virus-19.php>> [Consultado em Outubro 2012].

3. Classificação dos vírus

Na tentativa de criar um sistema universal para a classificação dos vírus e uma taxonomia uniforme, em 1966 foi criado o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Carter e Saunders, 2007).

O ICTV reconhece cerca de 3000 espécies, 71 famílias, 11 subfamílias e 175 géneros. Os critérios taxonómicos mais importantes para a diferenciação entre as ordens, famílias e géneros são: tipo e organização do genoma viral, estratégia da replicação viral e estrutura do virião. A biologia molecular veio contribuir em grande parte para o aparecimento de um sistema de classificação mais simples do que o sistema taxonómico que se revelava mais complexo, uma vez que através da análise detalhada do material genético representativo de algumas famílias de vírus, foi possível agrupá-los segundo o seu genoma viral, tarefa que se verificaria mais tarde ser bastante mais simples (Carter e Saunders, 2007).

Assim, em 1971 David Baltimore, vencedor de um prémio Nobel em Fisiologia e Medicina (em 1975) inventou o chamado Sistema de Baltimore. Através deste sistema, conhecendo a estrutura do genoma viral é possível deduzir os passos essenciais que devem ocorrer na produção de RNA. Com base neste pressuposto, Baltimore classificou os vírus em 7 grupos:

Grupo I: Vírus de DNA de cadeia dupla (dsDNA)

Estes genomas podem ser lineares ou circulares. O RNA mensageiro (mRNA) é obtido por transcrição do genoma levada a cabo por enzimas celulares ou por enzimas virais existentes no virião (exemplos: Adenovírus e Herpesvírus) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Grupo II: Vírus de DNA de cadeia simples (ssDNA)

Neste grupo, o DNA de cadeia simples é transcrito para o mRNA antes da produção das proteínas. No entanto, o RNA pode ser produzido a partir de apenas um molde de DNA de cadeia simples, independentemente do seu sentido. A síntese de DNA deverá preceder a produção de mRNA nos ciclos de replicação destes vírus. O genoma de cadeia simples é produzido por polimerases DNA (exemplo: Parvovírus) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Grupo III: Vírus RNA de cadeia dupla (+/-) (dsRNA)

Neste grupo os vírus de RNA de cadeia dupla apresentam uma cadeia positiva e outra negativa. A cadeia de sentido negativo (-) dsRNA é transcrita para mRNA por uma RNA polimerase viral, produzindo proteínas virais. Os novos mRNA (s) são encapsulados e copiados para produzir dsRNA (exemplo: Reovírus) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Grupo IV: Vírus RNA de cadeia simples sentido positivo (ssRNA)

Os genomas de (+) ssRNA geralmente são traduzidos diretamente em proteínas por ribossomas do hospedeiro. O genoma é replicado em dois passos. Primeiro, a partir da cadeia de sentido positivo é formada uma cadeia de sequência complementar (sentido negativo). Em seguida, esta cadeia de (-)ssRNA é utilizada como molde para a síntese do genoma viral (+)ssRNA (exemplo: Picornavírus) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Grupo V: Vírus RNA cadeia simples sentido negativo (ssRNA)

No que diz respeito à replicação deste vírus, uma vez que as células hospedeiras não codificam RNA polimerases, o material genético viral (sentido negativo) não é isoladamente infeccioso, a menos que seja transcrito para sentido positivo por um RNA polimerase viral. É comum os viriões conterem RNA polimerases empacotadas, as quais atuarão prontamente para gerar cópias infetivas (sentido positivo) do genoma (por exemplo: Filovírus - genericamente conhecido por Ébola) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Grupo VI: Vírus RNA cadeia simples (+) com DNA intermediário na formação de proteínas

São vírus que possuem um genoma constituído por RNA de cadeia simples de sentido positivo e que replicam o seu material genético gerando moléculas de DNA de cadeia dupla intermediária. Este processo é levado a cabo pela transcriptase reversa (enzima DNA polimerase RNA- dependente). Este DNA serve então como molde para o mRNA viral e síntese de genoma RNA pelas enzimas celulares (exemplo: Retrovírus) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Grupo VII: Vírus de DNA cadeia dupla transcriptase reversa (dsDNA-RT)

Possuem genoma constituído por DNA cadeia dupla e uma zona de DNA de cadeia simples. Esta falha é primeiro preenchida por enzimas celulares. Uma RNA-polimerase celular transcreve este DNA reparado em mRNA para os diversos genes e num RNA + contínuo, que cobre todo o genoma. Esta RNA+ é o molde para síntese, por uma transcriptase reversa codificada pelo vírus, de um híbrido RNA-DNA, que depois é convertido em DNA viral (exemplo: Vírus da hepatite B) (Baltimore,1971; Carter e Saunders, 2007).

Na figura abaixo encontra-se a síntese desta classificação:

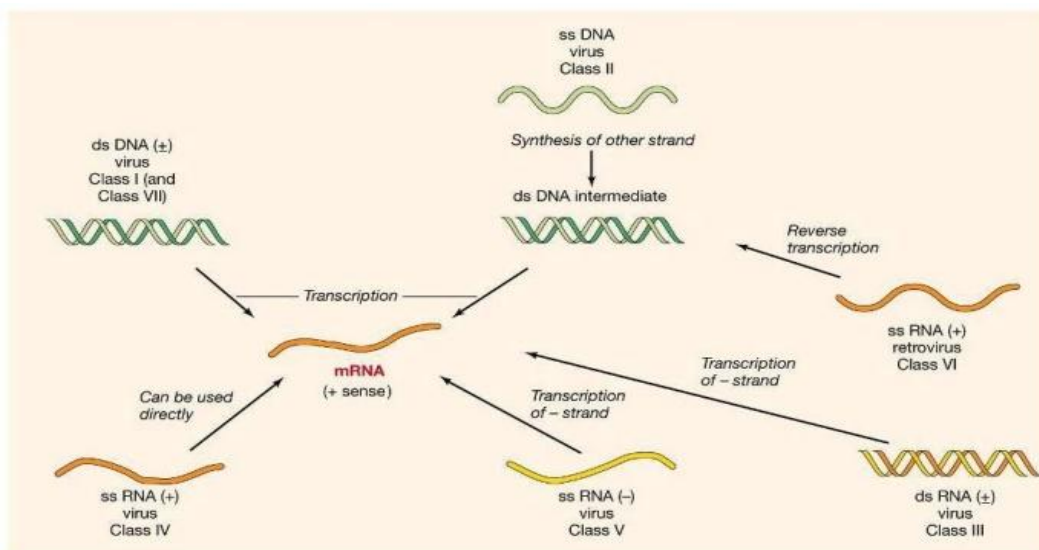


Figura 7- Classificação de Baltimore. Retirado de Evolution of Virus. Em linha. Disponível em <<http://varuncnmicro.blogspot.pt/2012/04/evolution-of-virus-is-it-fitting-right.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

4. Ciclo de replicação dos vírus

A compreensão do modo de funcionamento dos antivirais passa necessariamente pela compreensão do modo como os vírus se replicam, pois é nos diferentes passos de replicação do vírus que os antivirais atuam.

Deste modo, pretende-se realizar uma breve descrição do ciclo de replicação viral no sentido de incorporar a ação antiviral nas várias etapas do ciclo. É importante referir que estas fases (ou etapas) não se referem a nenhum vírus em particular. Mas sim, às semelhanças no padrão de replicação de diferentes vírus que infetam vertebrados. Por outro lado, nem todas estas etapas são detetáveis para todos os vírus. Algumas etapas poderão mesmo ocorrer simultaneamente.

Numa perspetiva mais simplificada, segundo Cann (2005), podemos considerar a existência de 7 fases de replicação viral: Adsorção, Penetração, Descapsidação, Replicação do Genoma Viral e dos Genes, Montagem, Maturação, Extrusão.

Seguidamente apresenta-se uma explicação sumária destas fases.

A) Adsorção

A adsorção corresponde à fase em que o vírus, após reconhecimento da célula alvo, se liga aos recetores da mesma. Tecnicamente, a adsorção do vírus consiste na ligação específica entre uma proteína de fixação do vírus a um recetor molecular da célula hospedeira. As moléculas alvo dos recetores na superfície celular podem ser proteínas (geralmente glicoproteínas) ou resíduos de carboidratos presentes nas glicoproteínas ou glicolípidos (Carter e Saunders, 2007; Cann, 2005; Ferreira e Sousa., 1998).

Esta interação da partícula viral com o recetor inicia alterações conformacionais que mais tarde preparam o vírus para a descapsidação. Alternadamente, o recetor celular poderá direcionar o virião para um caminho endocítico onde a descapsidação poderá ser despoletada pela diminuição do pH ou pela ação das protéases. Esta situação leva-nos à segunda etapa (Flint *et al.*, 2009).

B) Penetração

A penetração de célula alvo ocorre geralmente num curto período de tempo após a ligação do vírus ao recetor na membrana celular. Ao contrário da adsorção, a penetração celular é geralmente um processo energeticamente dependente ou seja, a célula tem de ser metabolicamente ativa para que tal possa ocorrer. Este processo pode ocorrer por três mecanismos (Cann, 2005).

- Translocação da partícula viral através da membrana citoplasmática da célula. Este é um processo menos frequente e tem de ser mediado por proteínas existentes na cápside do vírus e recetores específicos da membrana.
- Endocitose do vírus nos vacúolos intracelulares. Este mecanismo é o mais vulgar uma vez que envolve um processo que já é característico das células, usado como forma de absorverem material.
- No caso de vírus com invólucro, dá-se uma fusão destes vírus com a membrana celular diretamente na superfície da célula ou por endocitose numa vesícula citoplasmática, o que requer a presença de uma proteína de fusão específica no invólucro do vírus (proteína F). Estas proteínas promovem a união da membrana celular e do vírus, resultando na nucleocápside, a qual é diretamente depositada no citoplasma.

C) Descapsidação

Esta fase corresponde ao processo de disrupção total ou parcial do virião que, uma vez no interior da célula, liberta o ácido nucleico viral.

Como referido anteriormente, este processo inicia-se por vezes logo na fase de absorção, em que a interação entre o recetor celular e a partícula viral pode provocar mudanças na sua conformação, preparando a cápside para a descapsidação. A partir daqui a descapsidação poderá ocorrer por um abaixamento do pH dentro do endossoma ou por ação de protéases (Carter e Saunders, 2007; Cann, 2005)

D) Replicação do Genoma Viral

Na maioria dos casos, o genoma é replicado no mesmo local onde ocorre a transcrição do material genético do vírus, isto é, no citoplasma ou no núcleo. Normalmente os vírus

de RNA replicam-se no citoplasma e os de DNA no núcleo, no entanto existem exceções como o retrovírus para o RNA e o da Variola para o DNA (Flint *et al.*, 2009).

Esta é a fase em que ocorre a síntese de todas as proteínas virais, sejam enzimáticas, reguladoras ou estruturais e a replicação do genoma viral. No papovavírus esta etapa pode ser muito simples pois são sintetizadas apenas proteínas estruturais e algumas proteínas que cooperam com as enzimas celulares para a replicação do DNA. Pelo contrário em vírus de RNA, já é necessário a síntese de enzimas virais para replicarem ou transcreverem o RNA viral, função para que a célula não esta preparada. Noutros ainda, mais complexos, como por exemplo os herpes vírus o genoma codifica para muitas enzimas homólogas de enzimas celulares e ainda outras funções, por exemplo a indução da morte celular programada (Ferreira e Sousa., 1998).

E) Montagem

A montagem corresponde ao processo de formação do virião. O local da montagem depende do local onde se terá dado a replicação do genoma viral dentro da célula, variando assim para os diferentes vírus (Cann, 2005)

Por exemplo, nos poxvírus e reovírus a montagem ocorre no citoplasma. Já nos adenovírus e parvovírus ocorre no núcleo. Na maioria dos casos as membranas celulares são usadas como âncoras para as proteínas do vírus, e é aqui que se inicia o processo de montagem. Este processo requer por isso uma especificidade considerável e grande coordenação entre as múltiplas reações que ocorrem. A inclusão do genoma viral pode ocorrer na fase inicial da montagem ou numa fase posterior, quando o genoma já se encontra contido na cápside proteica quase completa. Em determinados casos, como no HIV, a montagem termina no exterior da célula (Cann, 2005)

F) Extrusão

A libertação de partículas virais com invólucro (formadas a partir da membrana plasmática) é um processo complexo que compreende a indução de uma curvatura na membrana por componentes virais. Apesar da gemulação ter sido repetidamente visualizada, os mecanismos que a acompanham ainda não são totalmente compreendidos (Cann, 2005).

G) Maturação

A maturação é o passo do ciclo no qual o vírus se torna infeccioso. A maturação envolve mudanças estruturais na partícula viral que poderão resultar em clivagens específicas das proteínas da cápside para formar novos produtos ou mudanças conformacionais nas proteínas durante a montagem. Alternadamente poderão ocorrer alterações na estrutura interna, como condensação de nucleoproteínas com o genoma do vírus, provocando alterações substanciais. Desta forma os viriões permanecem inativos até encontrarem uma nova célula hospedeira, reiniciando o ciclo (Cann, 2005).

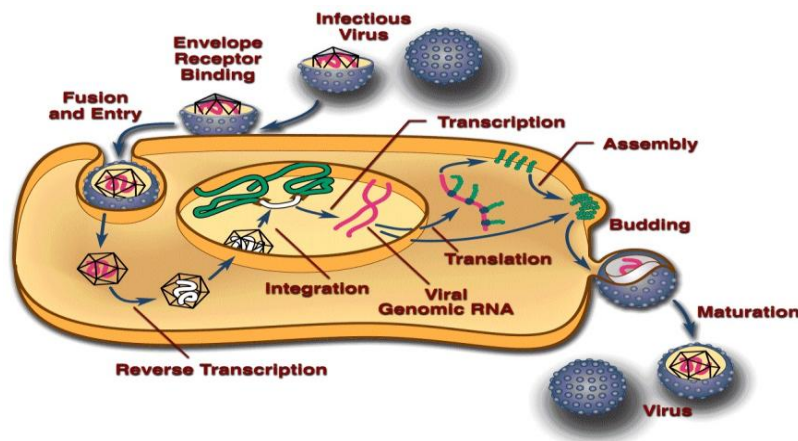


Figura 8- Exemplificação do ciclo de replicação do vírus (Golan et al., 2007)

5. Mutações dos vírus

Quando os ácidos nucleicos virais são copiados pelas polimerases por vezes ocorrem erros. Se o erro se encontrar na sequência de codificação de uma proteína, resultando numa alteração do aminoácido codificado, então estaremos perante uma mutação (Wagner e Hewlett., 2004).

Neste sistema entrará posteriormente a seleção natural, que irá favorecer as mutações que melhor servirem as funções e “sobrevivência” do vírus.

As mutações podem ocorrer essencialmente por dois mecanismos diferentes: mutação espontânea e mutação induzida.

As mutações espontâneas são endógenas, resultando de erros das polimerases de DNA e RNA, ao incorporar formas tautoméricas naturais dos nucleótidos. Os vírus DNA são

tipicamente mais estáveis geneticamente do que os vírus RNA: a taxa de mutação é de $10E-8$ a $10E-11$ por nucleótido incorporado. Tal acontece porque, em parte, as polimerases de DNA frequentemente possuem alguma habilidade para correção de erros. Os vírus RNA são consideravelmente menos estáveis com taxas de mutação espontânea na ordem dos $10E-3$ a $10E-4$ por nucleótido incorporado. As polimerases de RNA tipicamente não possuem capacidade de correção de erros. Apesar disso, alguns vírus RNA são relativamente estáveis geneticamente (polivírus). Como resultado, os vírus DNA como os papilomavírus evoluem muito mais lentamente que os vírus RNA como os picornavírus. No entanto, há que ter cuidado com esta generalização porque, por exemplo o vírus Hepatite B (HBV) é um vírus DNA mas como a replicação do seu genoma ocorre via transcrição reversa, observam-se taxas de erro semelhantes às verificadas em vírus RNA (Wagner e Hewlett., 2004).

As mutações induzidas são exógenas, resultando da exposição a agentes mutagénicos (químicos ou radiação) que aumentam significativamente a taxa de mutação dos vírus. A radiação U.V, por exemplo, pode provocar a formação de dímeros de pirimidinas, radiação ionizante pode danificar o DNA diretamente pela quebra de ligações químicas ou indiretamente por formar radicais livres que por sua vez irão danificar o DNA (Wagner e Hewlett., 2004).

6. Papel dos antivirais no ciclo de replicação dos vírus

Compreendido o ciclo geral que envolve a replicação dos vírus e as mutações a que estão sujeitos, realizar-se-á seguidamente uma abordagem aos antivirais e à forma como podem atuar numa infeção viral.

Os agentes antivirais atualmente disponíveis não destroem os viriões, atuando antes por inibição da sua replicação, interferindo nalguns passos do ciclo descrito anteriormente. Deste modo, torna-se importante a participação do sistema imunitário do paciente na eliminação do vírus infeccioso. Genericamente, cada um dos passos descritos anteriormente e em particular as enzimas implicadas nos mesmos são passíveis de intervenção terapêutica (Field e Clercq, 2004; Chung, 2011). Assim, os antivirais podem atuar essencialmente:

- Na prevenção da entrada do vírus;
- Bloqueando a replicação RNA/DNA na célula;

- Inibindo os fatores da transcriptase para o DNA viral;
- Destruindo as proteases virais, para que as proteínas virais não sejam clivadas e rearranjadas numa forma otimizada;
- Impedindo a saída do vírus da célula.

Os antivirais que atuam como prevenção da entrada do vírus na célula são geralmente substâncias capazes de bloquear a interação do vírus com a membrana celular, ligando-se a este ou ao próprio recetor. Poderão ser ainda péptidos similares aos recetores celulares, bloqueando a ligação do vírus à célula hospedeira. Como exemplo deste tipo de fármaco temos o T-20 (enfuvirtide) que inibe o processo de fusão entre a membrana celular e o invólucro do HIV-1. Estruturalmente é um polipeptídeo que forma uma hélice α que interatua com as membranas biológicas (Field e Clercq, 2004).

A replicação e a transcrição do genoma são processos sobrepostos nos vírus e por isso, estas etapas são analisadas conjuntamente. Os antivirais que atuam nesta fase fazem-no bloqueando a síntese de DNA e RNA (Field e Clercq, 2004).

A síntese proteica ou de tradução é a etapa do ciclo em que o parasitismo obrigatório dos vírus é mais pronunciado: como os vírus não contêm ribossomas na sua estrutura, a síntese proteica realiza-se na sua totalidade pelos ribossomas celulares. Por esta razão, qualquer substância que iniba a síntese proteica viral, à partida, também afetará gravemente o metabolismo celular e não se conhece substâncias sintéticas que possam inibir seletivamente a tradução dos vírus mRNA (Field e Clercq, 2004; Razonable 2011).

Na etapa que compreende a montagem viral os fármacos utilizados podem ser inibidores de protease (IP), uma vez que estas enzimas atuam na clivagem de polipéptidos grandes, de modo a originar proteínas estruturais que após montagem irão proporcionar a maturação viral (Field e Clercq, 2004).

No processo de extrusão, os fármacos (Oseltamivir e Zanamivir) utilizados atuam inativando a enzima que, existindo no invólucro de muitos vírus, remove os resíduos de ácido neuramínico presentes nas membranas celulares. Sendo este ácido responsável pela ligação do vírus à membrana celular, a inibição da enzima presente no vírus, impedirá a libertação deste e consequentemente da sua saída (Dias, 2000).

Capítulo III - Antivirais

O verdadeiro esforço aplicado no sentido da criação de antivirais remonta aos anos 50, em que os investigadores procuravam atuar nos inibidores da replicação do vírus da varíola (Flint et al., 2009).

No entanto, apenas nos anos 60 é que se dá a primeira administração bem-sucedida de um fármaco antiviral contra esta doença (Saxena et al., 2009). Entre os anos 60 e 70, com um maior conhecimento de como se desenvolviam as doenças virais, a indústria farmacêutica empenhou-se mais na descoberta de novos antivirais, com o lançamento de programas de monitorização que permitiam pesquisar químicos com estas propriedades (Flint et al., 2009). O maior problema na descoberta do antiviral “ideal” surge porque este deve bloquear a replicação do vírus sem afetar a célula hospedeira, parâmetro bastante difícil de executar pois os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que exploram a maquinaria celular.

Até que um antiviral seja lançado no mercado, desde a sua descoberta podem passar anos e embora se conheça os seus efeitos, pode não se compreender na totalidade o seu funcionamento. Tal é o caso da Ribavirina, sintetizada em 1972, cujo seu mecanismo de ação ainda permanece controverso. (Flint et al., 2009).

No entanto acredita-se que nas futuras décadas, com o desenvolvimento da tecnologia nesta área nomeadamente da Bioinformática, os antivirais possam ser rapidamente descobertos, testados e aprovados (Flint et al., 2009).

1. Modo de ação dos antivirais e respectivos alvos

Algumas infeções virais podem ser controladas de forma eficiente por medidas preventivas de saúde pública como por exemplo a vacinação, eliminação do vetor, quarentena, entre outras. No entanto, para muitas outras infeções, algumas destas medidas não têm qualquer efeito.

Apesar do conhecimento adquirido sobre os vírus conhecidos ser cada vez maior, após quase 50 anos de pesquisa, os fármacos antivirais continuam a ficar muito aquém no que diz respeito à quantidade (Flint et al., 2009).

Na verdade, atualmente os fármacos antivirais disponíveis são ainda menos de 50, estando grande parte direcionados para o HIV e HSV (Flint et al., 2009). Tal, poderá ser facilmente constatado pela tabela apresentada em anexo (ver anexo 1).

Neste ponto, pretende-se discutir os fármacos antivirais disponíveis, bem como os principais alvos.

Os fármacos antivirais podem ser divididos consoante o alvo disponível e o seu modo de ação. Assim, dos fármacos antivirais podem ser separados segundo:

- i. Inibidores de fusão/ adsorção
- ii. Inibidores de descapsidação
- iii. Inibidores de DNA polimerase
- iv. Inibidores de transcrição reversa
- v. Inibidores da integrase
- vi. Inibidores de protéase
- vii. Inibidores da transmissão de vírus
- viii. Inibidores da neuramidase

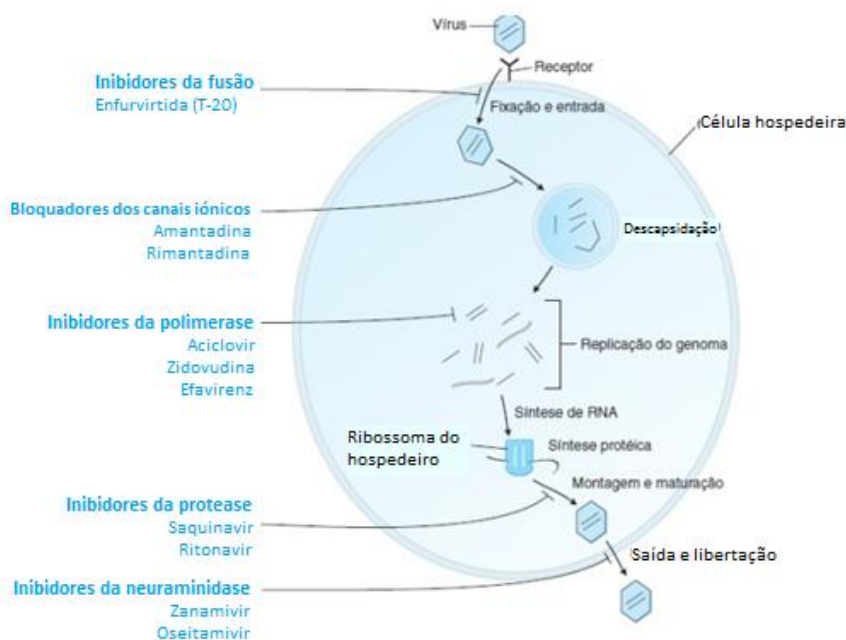


Figura 9- Descrição dos principais alvos e respectivos antivirais (adaptada de Golan et al., 2007)

i. Inibidores de fusão/absorção

Este grupo inclui os antivirais que têm como alvo os recetores das células hospedeiras e as proteínas da superfície viral.

Os inibidores de fusão/absorção inibem a fixação do vírus à célula hospedeira, evitando assim a entrada do vírus na célula. Eles atuam sobre as proteínas da superfície viral como o Enfuvirtida, ou sobre os recetores celulares, Maraviroc. O Maraviroc liga-se ao recetor CCR5 presente na membrana das células CD4+ dos linfócitos (Saxena et al, 2009; Moore e Dams, 2003).

1.1) Enfuvirtida

A Enfuvirtida (T-20) pode ser citada como um exemplo deste tipo de inibidores. É um antirretroviral que atua impedindo a fixação do vírus às células hospedeiras. Quando o vírus (por exemplo HIV-1) se liga a uma célula, a glicoproteína transmembranar (gp41), deve fixar o invólucro do virião com a membrana da célula por forma a libertar o seu conteúdo no citoplasma (Golan et al., 2007).

Para isso, a gp41 tem de sofrer uma mudança conformacional iniciada pela interação entre diferentes regiões da molécula. A Enfuvirtida é um peptídeo constituído por 36 aminoácidos com a sequência de uma região gp41, que ligando-se a outra sequência de gp41 vai inibir a mudança conformacional (Golan et al., 2007).

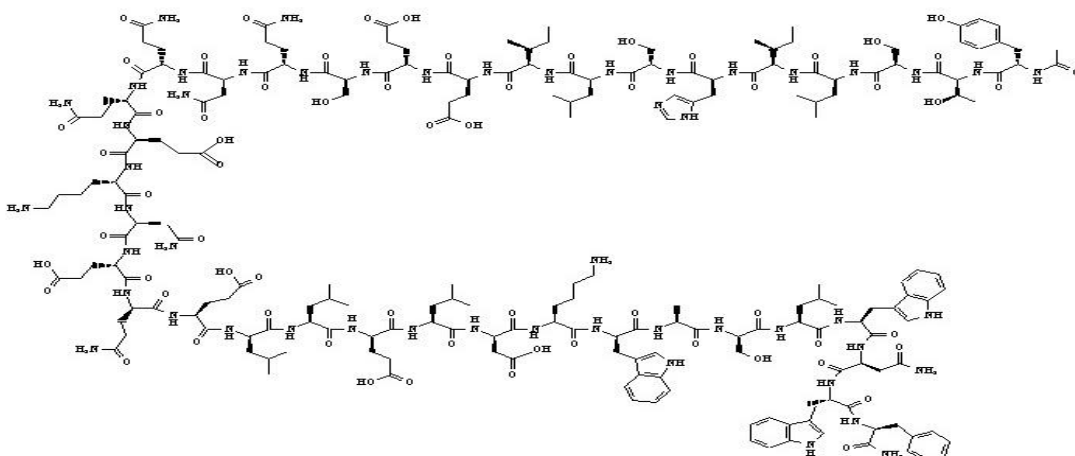


Figura 10- Estrutura da Enfuvirtida

(retirada de Golan et al., 2007)

ii. Inibidores da Descapsidação

Os inibidores da descapsidação funcionam por inibição da proteína M2, proteína membranar que funciona como canal iónico. Este canal permite que protões penetrem no invólucro viral e acidifiquem o centro do vírus, fazendo com que este se “desmonte”, libertando o ácido nucleico viral. Dentro destes inibidores temos a Amantadina e Rimantadina (análogo da amantadina) (Golan et al., 2007; Fredericksen., et al 2002).

2.1) Amantadina

A amantadina foi o primeiro fármaco antiviral potente e altamente específico contra qualquer vírus (Flint et al., 2009).

Funciona como inibidor de descapsidação viral, com atividade exclusiva contra o vírus influenza A (mas não contra o vírus influenza B ou C).

Os viriões do influenza penetram nas células através endocitose, mediada por recetores e são agregados em endossomas. Com a acidificação dos endossomas, devido à ação de uma bomba de protões endossómica, dá-se uma mudança drástica na conformação da proteína do invólucro viral (hemaglutinina). Essa alteração permite a fusão do invólucro do vírus influenza com a membrana do endossoma. Esta ação por si só poderia libertar o genoma de RNA do virião, mas não é suficiente para permitir a sua transcrição. É necessário ocorrer outro processo dependente do pH no interior virião. Tal consiste num influxo de protões através de um canal chamado M2 existente no invólucro viral, que induz a dissociação da proteína matriz do virião do restante da ribonucleoproteína (Flint et al., 2009). A amantadina inibe o fluxo de protões através do M2. A especificidade da amantadina pelo vírus Influenza A e não Influenza B pode ser compreendida pelo facto de os genomas virais do influenza B não codificarem a proteína M2 (Flint et al., 2009).

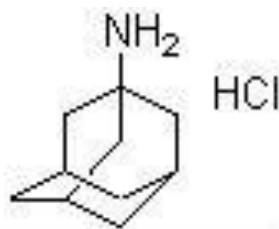


Figura 11- Estrutura da Amantadina
(retirada de Golan et al., 2007)

iii. Inibidores da DNA polimerase

A maioria dos fármacos que inibem a replicação do genoma viral atua através da inibição de uma polimerase. Cada vírus utiliza uma polimerase para a replicação do seu genoma. Sendo os vírus a codificar as suas próprias polimerases, tornam-se um excelente alvo para os fármacos antivirais (Enomoto., et al 2010).

Dentro deste grupo de antivirais encontram-se três tipos de inibidores: os análogos nucleosídeos, os análogos não nucleosídeos e os análogos nucleótidos (Enomoto., et al 2010).

3.1) Análogos nucleosídeos

Para exercerem os seus efeitos, os análogos nucleosídeos precisam de ser ativados por fosforilação, habitualmente à forma de trifosfato. Os trifosfatos obtidos vão “imitar” os trifosfatos de desoxirribonucleosídeos (substratos naturais das DNA polimerases). Os análogos nucleosídeos inibem as polimerases ao competir com o substrato trifosfato natural. Geralmente, estes análogos são também incorporados na cadeia de DNA em crescimento, onde frequentemente interrompem este processo (Elion, 1986).

O aciclovir é um dos fármacos pertencente a este tipo de inibidores de DNA polimerase, sendo o exemplo de um fármaco específico, altamente eficaz contra o HSV (genital e oral) e, até certo ponto contra o VVZ. Tendo sido descoberto em 1974, só em meados dos anos 80 é que este antiviral atingiu o seu potencial máximo no combate ao HSV (Flint et al., 2009; Pellet, 2007).

O aciclovir é um análogo nucleosídico da guanina (base azotada utilizada pelo vírus para a replicação do seu DNA), contendo um grupo açúcar acíclico (Elion, 1986).

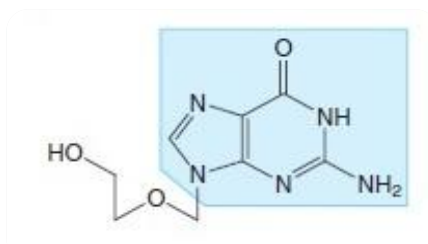


Figura 12- Molécula do Aciclovir (retirada de Golan et al., 2007).

A ativação do fármaco requer a presença de 3 cinases na célula para converter o aciclovir num derivado trifosfatado (Flint et al., 2009).

Dado que a enzima timidina cinase (TK) não se encontra em células normais (não infetadas), o aciclovir não tem qualquer efeito na replicação do DNA do hospedeiro, uma vez que não pode ser fosforilado e incorporado no DNA, resultando numa baixa toxicidade para este. (Flint et al., 2009; (Golan et al., 2007).

As enzimas celulares completam a síntese do trifosfato de aciclovir, o qual é incorporado no DNA viral pela DNA polimerase viral, inibindo a replicação do vírus. Como o aciclovir tem falta do grupo 3'-OH do anel do açúcar, a cadeia de DNA termina. (Flint et al., 2009).

O ganciclovir é um derivado do aciclovir desenvolvido para tratar as infeções pelo CMV (Lalezari et al., 2002).

Nas células infetadas pelo CMV, o ganciclovir é fosforilado inicialmente a monofosfato de ganciclovir pela proteína cinase viral UL97. Posteriormente, as cinases celulares fosforilam-no a trifosfato de ganciclovir, o qual é metabolizado lentamente no meio intracelular. Como a fosforilação depende em grande medida da cinase do vírus, a fosforilação do ganciclovir ocorre preferencialmente em células infetadas (Flint et al., 2009; Lalezari et al., 2002).

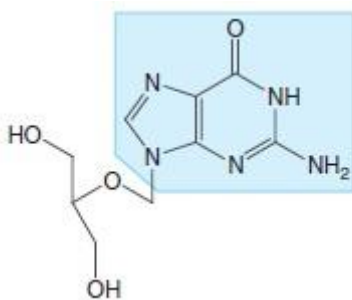


Figura 13- Estrutura do Ganciclovir
(retirada de Golan et al., 2007).

A seletividade destes fármacos depende do grau com que as enzimas virais fosforilam mais eficientemente o fármaco do que as enzimas celulares, bem como o grau com que

a síntese de DNA viral é mais potente e efetivamente inibida do que as funções celulares (Golan et al., 2007).

O desafio da indústria farmacêutica na manipulação dos análogos nucleosídeos é formular um fármaco que seja semelhante com o nucleosídeo natural para que possa ser ativado por enzimas celulares, porém nem tão semelhante a ponto de inibir os processos celulares (Golan et al., 2007).

3.2) Inibidores análogos não nucleosídeos

Os inibidores análogos não nucleosídeos surgiram como necessidade de atuar seletivamente sobre as enzimas virais, ao contrário dos nucleosídeos que tanto atuam sobre as enzimas virais como sobre as enzimas celulares. Este tipo de fármacos não necessita de ativação por enzimas celulares ou virais.

O foscarnet (ácido fosfonofórmico) inibe especificamente a DNA polimerase viral (HSV), em concentrações que não afetam a DNA polimerase celular e inibe também seletivamente a transcriptase reversa dos retrovírus (HIV). Possui um espectro de atividade relativamente amplo *in vitro*, uma vez que inibe tanto as DNA polimerases como as transcriptases reversas. É essencialmente virustático, pelo que obriga a um tratamento continuado. Não necessita da ativação prévia (Golan et al., 2007).

Clinicamente é utilizado no combate à infecção por HSV e CMV, quando a terapia com aciclovir ou com ganciclovir respectivamente não é bem-sucedida, devido ao desenvolvimento de resistência (Flint et al., 2009).

O foscarnet inibe diretamente a DNA polimerase viral, dado ser um análogo inorgânico dos pirofosfatos. A seletividade resulta da sensibilidade aumentada da DNA polimerase viral em relação às enzimas celulares. (Flint et al., 2009). Dado que este fármaco imita tão estreitamente uma substância natural (pirofosfato), a seletividade do foscarnet não é tão elevada quanto a do aciclovir. (Flint et al., 2009). As principais desvantagens do uso do foscarnet incluem a falta de biodisponibilidade oral e baixa solubilidade, o comprometimento renal constitui a sua principal toxicidade, que limita a dose.

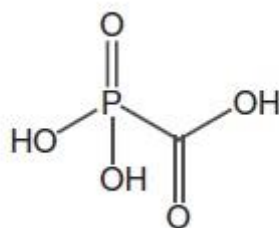


Figura 14- Estrutura do Foscarnet (retirada de Golan et al., 2007).

3.3) Análogos nucleotídeos

Os análogos nucleotídeos diferem dos nucleosídeos por possuírem na sua estrutura química um grupo fosfato, resultando num mecanismo diferente de atuação

O cidofovir é um análogo nucleotídeo que atua igualmente na DNA polimerase viral, cujo mecanismo de ação se encontra seguidamente descrito (Golan et al., 2007).

Este análogo de citosina contendo fosfato, também conhecido como HPMPS (hidroxifosfonilmetoxipropilcitosina), representa um desvio no mecanismo de ação dos análogos nucleosídeos (Golan et al., 2007).

Com o grupo fosfonato o cidofovir já se encontra fosforilado, não necessitando de cinases virais para a sua fosforilação. Deste modo, torna-se ativo contra mutantes virais deficientes em cinase, resistentes ao aciclovir (Golan et al., 2007).

O cidofovir é utilizado no tratamento do HPV, na reinite por CMV em pacientes com HIV (Snoeck et al., 2001). Apesar de ser um composto fosforilado, penetra nas células com eficiência razoável. É ainda fosforilado duas vezes por enzimas celulares, produzindo um análogo de dCTP que inibe de forma mais potente as DNA polimerases do vírus do que as DNA polimerase celulares (Golan et al., 2007).

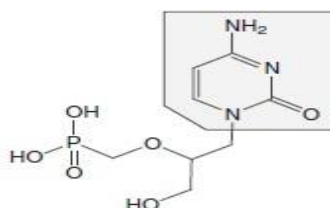


Figura 15- Estrutura do Cidofovir (retirada de Golan et al., 2007).

iv. Inibidores da Transcriptase Reversa

A transcriptase reversa (TR) é uma DNA polimerase capaz de copiar tanto o DNA quanto o RNA. A TR transcreve o genoma retroviral de RNA em DNA de cadeia dupla, após a entrada do vírus numa nova célula (Golan et al., 2007; Razonable, 2011).

Os inibidores da TR atuam sobre a replicação viral, impedindo que haja conversão do RNA viral em DNA o qual, posteriormente entraria no núcleo da célula hospedeira.

Dentro destes fármacos e, tal como os inibidores de DNA polimerase existem as NRTI, ntRTI e NNRTI.

4.1) Análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (NRTI)

Como exemplos de NRTI podem apresentar-se a Zidovudina e Lamivudina. Todos estes análogos atuam como elementos obrigatórios da terminação de cadeia.

A zidovudina é um análogo nucleosídeo com um açúcar alterado. Especificamente contém uma base timina ligada a um açúcar em que a 3'-OH normal foi convertida num grupo azido (Golan et al., 2007).

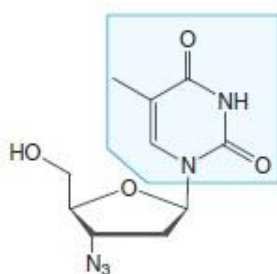


Figura 16- Estrutura do Zidovudina
(retirada de Golan et al., 2007).

A zidovudina só é ativo quando trifosforilado (sendo fosforilado pelas quinases celulares. A zidovudina trifosfato bloqueia a transcrição inversa por dois mecanismos:

- Inibe a transcriptase reversa (para a qual apresenta uma afinidade 100x superior à apresentada para as DNA polimerase das células hospedeiras);
- Serve de substrato à transcriptase reversa incorpora-se na cadeia de DNA nascente provocando a paragem da sua síntese (terminador de cadeia) (Golan et al., 2007).

Muito ativo *in vitro* contra retrovírus, incluindo o HIV. Em relação aos efeitos adversos os mais frequentes e mais graves são: anemia, neutropenia, leucopenia (implicam por vezes transfusões de sangue frequentes), cefaleias, mialgia, vômitos e náuseas. São conhecidas estipes com sensibilidade reduzida a Zidovudina, devido a mutagénesse da transcriptase reversa (Golan et al., 2007).

A lamivudina é um análogo nucleosídico da citosina, que necessita de ser ativado pelas cinases intracelulares a fim de formar lamivudina-trifosfato (forma ativa) que posteriormente atua como terminador de cadeia (Golan et al., 2007).

Tem-se mostrado eficaz ao bloquear a transcriptase reversa do HBV e HIV.

O fármaco é altamente biodisponível e tem baixa toxicidade, sendo indicada no tratamento de infecções crônicas como a do HBV. A principal limitação no uso da lamivudina é a ocorrência de resistências, uma taxa de 16%-32% durante o primeiro ano de tratamento e aumenta em 15% a cada ano de tratamento adicional. (Flint et al., 2009).

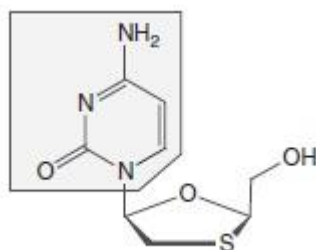


Figura 17- Estrutura do Lamivulina
(retirada de Golan et al., 2007).

4.2) Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTI)

Estes fármacos ligam-se próximo do sítio catalítico da transcriptase reversa. Os NNRTI executam a ligação a TR a um trifosfato de nucleosídeo e a um molde iniciador, porém inibem a junção dos dois. Os NNRTI são biodisponíveis por via oral e, tipicamente, seus efeitos adversos são menos graves que aqueles do foscarnet e da maioria dos análogos nucleosídeos. A principal limitação para o uso de NNRTI consiste no rápido desenvolvimento de resistência, exigindo o uso destes fármacos em associação com outros agentes retrovirais. Dentro destes fármacos temos o Efavirenz, Nevirapina e Delavidina (Dieterich.,et al 2004).

A nevirapina é utilizada no tratamento do HIV-1, inibindo a sua replicação por interferência com a atividade da transcriptase reversa de polimerase viral, sendo geralmente combinada terapêuticamente com outros agentes anti-retrovirais (Saxena et al., 2009).

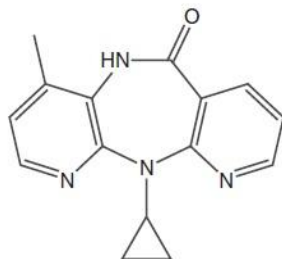


Figura 18- Estrutura do Nevirapina (retirada de Golan et al., 2007).

4.3) Análogos nucleotídeos inibidores da transcriptase reversa

Como exemplo de ntRTI existem o adefovir e o tenofovir.

O adefovir é um análogo nucleotídeo da adenina. Este fármaco é utilizado especialmente no tratamento da infecção crônica do HBV que desenvolveram resistência à lamivudina. O adefovir por fosforilação forma o metabolito ativo fosfato de adefovir, através das cinases celulares, que se assemelha ao trifosfato de deoxiadenosina, a molécula que a transcriptase reversa incorpora na cadeia de DNA. No entanto, o adefovir não pode ser adicionado a essa cadeia, pelo que impede a transcriptase reversa de a completar, interrompendo o ciclo de replicação do vírus (Kahn et al., 1999; Feng et al., 2009).

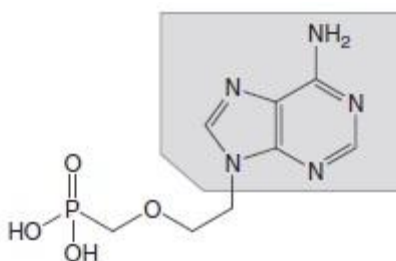


Figura 19- Estrutura do Adefovir (retirada de Golan et al., 2007).

v. Inibidores da Integrase

Os inibidores da integrase têm como alvo a inibição da enzima integrase responsável pela integração do DNA viral no genoma do hospedeiro.

A 16 de Outubro de 2007, a FDA aprovou o raltegravir para o tratamento da infecção causada pelo HIV-1, primeiro fármaco deste grupo aprovado para uso humano. (Temesgen et al., 2008).

O mecanismo de ação do raltegravir envolve a integrase, que é uma enzima necessária ao vírus HIV-1 para que consiga inserir com sucesso o seu DNA viral no DNA do hospedeiro. Os inibidores da integrase, como o raltegravir, bloqueiam o HIV-1 antes de ele alterar o material genético humano. As células humanas não possuem a enzima integrase, portanto, os efeitos adversos e a toxicidade para células humanas é baixa (Flint et al., 2009 e Golan et al., 2007).

O raltegravir exibe uma toxicidade muito baixa, alta potência e farmacocinética favorável. Na terapia de primeira linha, a formulação oral provoca uma grande diminuição na carga de RNA viral, abaixo dos níveis de detecção dentro de algumas semanas. (Temesgen et al., 2008; Métifiot et al., 2010).

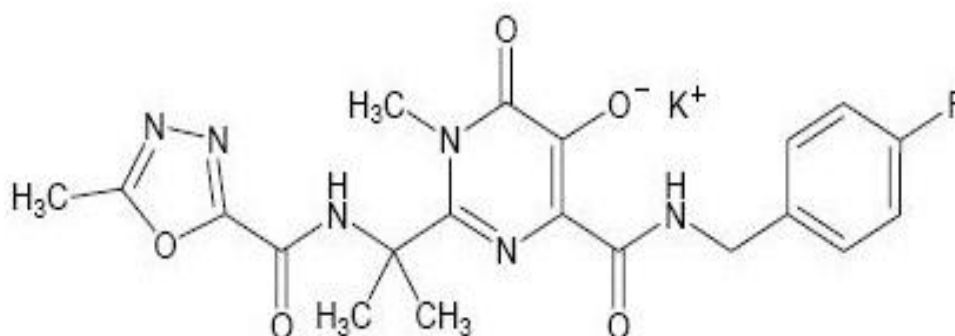


Figura 20-Estrutura do Raltegravir
(retirada de Golan et al., 2007).

vi. Inibidores da protéase

Para muitos vírus, incluindo o HIV, a montagem das proteínas e do ácido nucleico em partículas não é por si só suficiente para produzir vírus infecciosos (Flint et al., 2009).

Por vezes é necessária uma etapa adicional, a maturação. Geralmente é necessária uma proteína viral (a protéase), responsável pela clivagem das proteínas precursoras para formar unidades funcionais ou libertar componentes estruturais durante o processo de montagem de partículas organizadas, originando assim novos viriões (Golan et al., 2007).

Logo, os inibidores da protéase atuam sobre essa proteína viral. No caso do HIV, as células infetadas, expostas a inibidores da protéase continuam a produzir proteínas virais. No entanto, essas proteínas não são processadas de forma eficiente. Como resultado, as partículas virais são libertadas da célula infetada, imaturas e não infecciosas (Flexner, 1998; Martinazzo, 2008).

Os agentes antivirais, cujo alvo é a protéase são: Saquinivir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, etc (Golan et al., 2007).

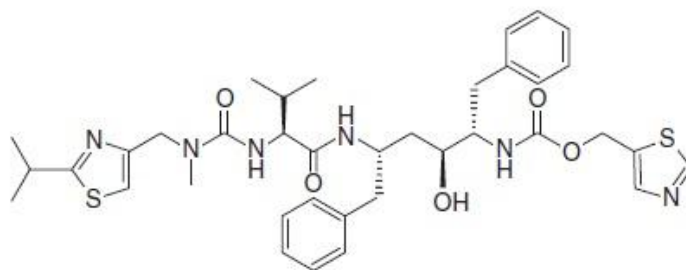


Figura 21- Estrutura do Ritonavir
(retirada de Golan et al., 2007).

vii. Inibidores da transmissão do vírus

Estes inibidores atuam nos percursos de transmissão do vírus, bloqueando qualquer componente chave nesse percurso, essencial para a transmissão do vírus. Ainda assim, os fármacos incluídos nesta classe considera-se possuírem mecanismos de ação desconhecidos, tal é o caso da Ribavirina (Graci e Cameron, 2005).

A ribavirina foi sintetizada em 1972 e desenvolvida como “agente antiviral de largo espectro”. Com efeito, a ribavirina exibe atividade contra numerosos vírus *in vitro* e *in vivo* (Golan et al., 2007).

A nível estrutural a ribavirina difere dos outros análogos nucleosídeos visto possuir um açúcar natural (ribose) fixado a um componente sintético que se assemelha mais às purinas.

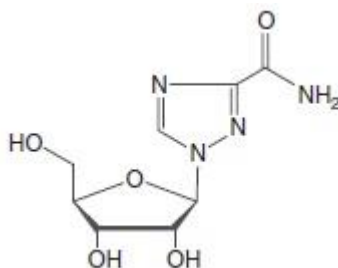


Figura 22-Molécula de Ribavirina
(retirada de Golan et al., 2007).

Embora o seu mecanismo de ação não seja ainda bem compreendido, sabe-se que é convertida em monofosfato de ribavirina pela adenosina cinase celular e que o fármaco inibe a monofosfato de inosina desidrogenase, reduzindo assim os reservatórios celulares de GTP (guanosina 5'-trifosfato) (Graci e Cameron, 2005; Flint et al., 2009).

A inibição da RNA polimerase viral poderá representar um segundo mecanismo seletivo possível para a ação da ribavirina (Graci e Cameron, 2005).

Mesmo desconhecendo na totalidade o seu mecanismo e toxicidade, este antiviral exibe ação terapêutica contra HSV, HCV, HIV, adenovírus, poxvírus, arenavírus (febres hemorrágicas, como a febre de lassa) e Influenza A (Flint et al., 2009).

viii. Inibidores da Neuramidase

Os inibidores da neuramidase têm como alvo a fase de libertação do novo vírus. A neuraminidase é uma enzima que desempenha um papel fulcral durante as fases finais de gemulação do virião das células infetadas. A neuraminidase é uma hidrólase que cliva as ligações glicosídicas do ácido neuramínico. Se esta enzima for inibida, os viriões não são libertados (Ferraris., et al 2010).

Estes fármacos têm-se revelado eficazes no tratamento do vírus Influenza A e B. Tal é o caso do zanamivir e oseltamivir (comercializado como Tamiflu) (Jackson., et al 2010).

Ambos os fármacos são inibidores da enzima neuraminidase, sintetizada pelos vírus Influenza A e B. Funcionam na fase de extrusão celular.

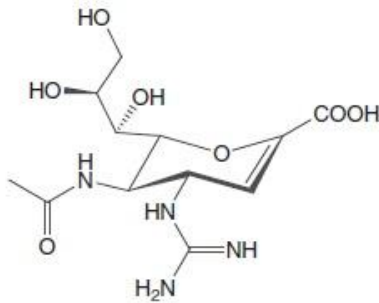


Figura 23- Molécula do Zanamivir (retirada de Golan et al., 2007).

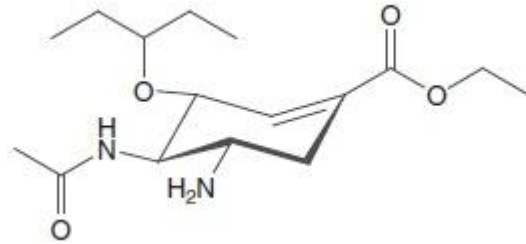


Figura 24- Molécula do Oseltamivir (retirada de Golan et al., 2007).

O fundamento lógico destes inibidores, que bloqueiam a libertação do vírus da célula hospedeira, provém do mecanismo de libertação do vírus. O vírus de Influenza fixa-se às células através da hemaglutinina e componentes de ácido siálico (encontrados em muitas glicoproteínas da superfície celular) (Nicholson., et al 2003). Após a saída do vírus Influenza das células, no final de um ciclo de replicação, a hemaglutinina presente nos novos viriões liga-se novamente à superfície celular, inibindo a libertação do vírus. No entanto, o vírus da influenza supera este problema dado que codifica uma enzima ligada ao invólucro chamada neuramidase, que cliva o ácido siálico das glicoproteínas da membrana, permitindo a saída do vírus. Sendo estes fármacos inibidores da neuramidase, impedem a saída do vírus, ficando este “preso” à célula e sem capacidade de se propagar para novas células (Golan et al., 2007; Beigel e Bray, 2008).

Capítulo IV- Antivirais: que futuro

1.Métodos de detecção de novos vírus

Atualmente um dos maiores desafios com que se deparam os investigadores na indústria farmacêutica é com a capacidade de prever ou antecipar o aparecimento de novos vírus, de forma a desenvolver fármacos, que possam ser utilizados imediatamente. A detecção de um novo vírus é precedida por vários acontecimentos. Assim primariamente um vírus sofre uma série de mutações/alterações evolutivas, transformando-se num novo vírus na maior parte das vezes só são feitas pesquisas/análises quando este infeta humanos e apresenta sintomas resultantes da infecção viral. Aquando do aparecimento de sintomas nos indivíduos, é feito um diagnóstico, de forma a determinar com eficácia o agente de infecção. Esta detecção permite indicar um possível tratamento. Os métodos de diagnóstico a nossa disposição são:

- Culturas celulares (visualização de efeitos citopáticos nas células)
- Elisa
- Métodos de imunofluorescência com fluorocromo
- Técnicas imunológicas e moleculares

Todos estes métodos apresentam eficácia, porém mostram possuir limitações principalmente em quadros clínicos mais sérios, onde o tempo é um fato diferencial para a sobrevivência do paciente (Wacha et al., 2011).

A aplicação de novas técnicas de diagnóstico rápido vai poder reduzir este intervalo de tempo de forma a melhorar a eficácia dos compostos antivirais. Técnicas Nucleares, como o uso de neutrografia na detecção de agentes infecciosos, principalmente bactérias e partículas virais, tem de ser mostrado um meio alternativo para o diagnóstico microbiológico, trazendo um ganho significativo no tempo de análise, por não necessitar de amostras pré-cultivadas em meio apropriado (Wacha et al., 2011).

Na técnica de neutrografia as amostras são submetidas a um feixe de neutrões térmicos. A interação desses neutrões com os vírus gera raios gama cujo espectro em energia é características da composição química das amostras. Pode-se detectar a presença de um vírus na amostra através de distinção das suas respectivas composições

elementares, podendo-se, inclusive realizar essas análises em tempo real (Wacha et al., 2011).

Estas novas técnicas nucleares de diagnóstico irão permitir um diagnóstico rápido do vírus que esta infetar o individuo, possibilitando uma intervenção terapêutica mais rápida e consequentemente mais eficaz. Quando um vírus é detetado precocemente, torna-se mais fácil elimina-lo do organismo, pois este só se replicou em algumas células, ou seja, só infetou uma quantidade mínima de células, por este motivo é tão importante um diagnóstico rápido (Wacha et al., 2011).

O grande problema surge quando o vírus que detetamos, é um “novo vírus “, e a terapia antiviral existente é ineficaz e desapropriada para o vírus em questão. Assim surge a necessidade de criar métodos que possam antecipar /prever a formação de novos vírus.

Muito recentemente um novo vírus foi descoberto na Grã-Bretanha num homem que esteve na Arábia Saudita. O novo vírus é um coronavírus, este tem ligação com o SARS (síndrome respiratório agudo grave; que já infetou a China em 2002 e matou 800 pessoas em todo mundo). Este coronavírus foi detetado em 2 indivíduos ambas as infeções foram originadas do Médio Oriente (Boheemen et al., 2012; Al-ahdal et al., 2012).

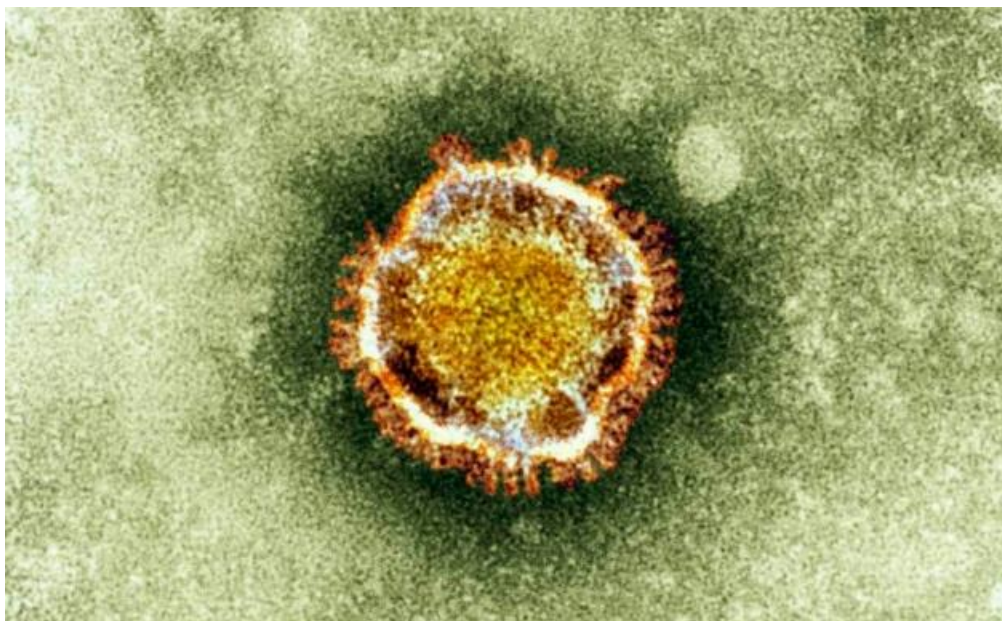


Figura 25 - Imagem microscópica do Vírus SARS. Retirado de SARS veterans tackle coronavirus. Em linha. Disponível em <<http://www.nature.com/news/sars-veterans-tackle-coronavirus-1.11513>> [Consultado em Outubro 2012]

O relatório da agência de proteção a saúde fez sequências genéticas do genoma do microorganismo, e revela que o vírus pode ser transmitido por animais – além de morcegos, a lista suspeita, inclui camelos, ovelhas e bodes. Os coronavírus provocam infecções respiratórias em humanos e animais. Os dois homens contaminados tiveram febre, tosse e dificuldades em respirar (Boheemen et al., 2012).



Figura 26- Zoonoses são fonte de novos vírus. Retirado de Vírus descoberto no Reino Unido pode ser transmitido por animais. Em linha. Disponível em <<http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2012/09/virus-descoberto-no-reino-unido-pode-ser-transmitido-por-animais.html>> [Consultado em Outubro 2012]

O paciente na Arábia Saudita acabou por falecer e o Britânico após ter passado pelos cuidados intensivos, recuperou. O vírus transmite-se por fluidos expelidos da tosse ou pelo espirro. Os investigadores acham que não se trata de uma doença altamente contagiosa, pois até ao momento os indivíduos que trataram os pacientes não evidenciaram qualquer tipo de sintoma. Os coronavírus são bastante frágeis, fora do hospedeiro sobrevivem em média um dia e são facilmente eliminados por detergentes e outros desinfetantes. Os cientistas ainda não sabem qual o melhor tipo de tratamento, mas as pessoas com sintomas graves necessitam de cuidados intensivos sobretudo a nível da respiração (Boheemen et al., 2012).

Os especialistas ainda não sabem a origem do microorganismo, estes especulam e analisam que se possa tratar de uma nova mutação de vírus já existente ou talvez seja uma infeção que já exista entre animais e só foi transmitido para aos seres humanos. Por enquanto a organização mundial de saúde descartou qualquer tipo de restrição a viagens ao Médio Oriente, onde os casos surgiram. Mas esta decisão encontra-se em constante reavaliação. Como se pode constatar através do exemplo anterior o aparecimento de novos vírus não é tao raro, como as vezes se possa pensar, desta forma torna-se importante e necessário a criação de métodos de deteção precoce de novos vírus, de

forma a poder garantir-se um tratamento eficaz e específico para cada tipo de infecção viral (Boheemen et al., 2012).

Mas esta não é de todo uma tarefa fácil, pois novos vírus podem emergir: a partir de novos hospedeiros em novas regiões globo, resultantes de mutações e ainda vírus reemergentes, que haviam entrando numa fase de latência e que se voltam a manifestar. Às deslocções dos indivíduos entre os países faz com que os vírus se espalhem por varias zonas do planeta, como no exemplo do coronavírus que é proveniente de Arábia Saudita, mas devidas as deslocções dos indivíduos um caso já foi verificado na Grã-Bretanha.

A interação homem-animal também tem contribuído para o aparecimento de novos vírus e novas estipes. Porque vírus que afetam animais podem ser transmitidos aos seres humanos. Ao longo de toda a história da virologia vários casos de vírus transmitidos dos animais aos humanos podem ser referenciados, por exemplo vírus da raiva, vírus da febre-amarela (mosquitos *Aedes aegypti*) (Carter e Saunders, 2007).

Também se suspeita que o vírus da imunodeficiência símia (SIV) poderá estar na origem HIV-1 HIV-2, devido a possíveis interações entre humanos e primatas (Carter e Saunders, 2007).

De fato se um vírus passar para um hospedeiro de outra espécie, poderá sofrer um série de alterações evolutivas no novo hospedeiro resultando num novo vírus.

Em relação por exemplo ao vírus do influenza A, os hospedeiros destes vírus são principalmente aves que ao migrarem para novas regiões provocam a disseminação do vírus, neste vírus o hospedeiro é uma ave, assim são elaborados estudos sobre as possíveis rotas migratórias, de forma a prever antecipadamente o local para onde o vírus possa ser transportado e conseqüentemente transmitido (Flores et al., 2009).

Os esforços dos investigadores ocorrem no sentido de prever possíveis transmissões de um vírus entre hospedeiros e analisar as alterações genéticas dos vírus que possam ocorrer na escala do tempo. Estas são possíveis estratégias que permitem controlar a disseminação do vírus, e assim poder adotar medidas preventivas de forma a evitar possíveis infecções virais (Flanagan et al., 2011).

A análise do material genético dos vírus, com intuito de verificar possíveis alterações genéticas ao longo do tempo, que poderá resultar num novo vírus permitirá futuramente criar antivirais específicos para o vírus em questão, de forma a eliminar o vírus atempadamente.

2. Limitações dos antivirais

Com o conhecimento que tem vindo a ser adquirido ao longo dos anos tanto a nível biológico, como a nível farmacológico, parece difícil de compreender o fato de existirem tão poucos antivirais disponíveis.

A verdade é que essa limitação se prende essencialmente com o fato de os antivirais não serem seletivos afetando simultaneamente o vírus na célula hospedeira e a célula não infetada, pelo facto de este ser um parasita obrigatório intracelular dependente da célula hospedeira para realizar as suas funções metabólicas. Isto irá conduzir inevitavelmente a uma citotoxicidade, sendo esta uma das muitas limitações inerentes aos antivirais e que constituem um desafio para os investigadores.

Deste modo as principais limitações a que estão sujeitos os antivirais são:

1. Toxicidade
2. Capacidade de resistência do vírus
3. Latência do Vírus
4. Custo e tempo de investigação

1) Toxicidade

Um dos problemas com que os investigadores se deparam aquando da síntese de antivirais é a toxicidade que lhes é inerente. O que aparenta ser um problema de resolução simples verifica-se mais complexo se considerarmos que os vírus são parasitas dos mecanismos celulares, dependendo destes para a sua replicação. Uma vez que os antivirais não possuem atividade específica contra vírus, vão obrigatoriamente afetar o funcionamento celular normal do organismo (Flint et al., 2009). De fato, não é fácil encontrar compostos capazes de atuar sobre o ciclo viral sem afetarem o

mecanismo da célula hospedeira (Cann, 2005). Por exemplo, muitos antivirais usados no combate ao HIV são altamente tóxicos para os glóbulos brancos, o que irá afetar ainda mais os pacientes imunodeprimidos (Bean, 2005).

É então de extrema importância a síntese de fármacos com menos efeitos tóxicos. A toxicidade pode ser descrita em termos do índice citotóxico (para as células) e índice terapêutico (para os hospedeiros). Este índice é obtido por divisão da dose que inibe a replicação viral sobre a dose tóxica para a célula do hospedeiro. O ideal é este índice ser o menor possível (Flint et al., 2009).

2) Capacidade de resistência do vírus

É um dado adquirido que os vírus, podem sofrer mutações muito rapidamente e desenvolver meios de codificação de genótipos resistentes aos fármacos existentes (Cann, 2005). Uma estirpe de um vírus é considerada resistente a um fármaco se for capaz de se replicar num organismo mediante uma dose desse fármaco que iniba a replicação de estirpes sensíveis (Saxena et al., 2009).

Os vírus que adquirem resistência aos fármacos apresentam uma ou mais mutações nos genes que codificam as proteínas alvo dos antivirais. Essas mutações podem resultar de substituições de aminoácidos, mas também de exclusões ou inserções destes. Estas resistências tornam-se particularmente problemáticas em doentes sob tratamento e quando as estirpes resistentes ao fármaco são transmitidas para outro indivíduo (Griffiths, 2009).

Outro dos grandes problemas é a chamada “resistência cruzada”, isto é, algumas mutações levam a que determinados vírus se tornem resistentes a inibidores similares. Por exemplo, os vírus mutantes do HIV resultam frequentemente de substituições de aminoácidos na transcriptase reversa, tornando-se resistentes a diferentes análogos nucleosídicos (Flint et al., 2009). Verificou-se que o nelfinavir/ saquinavir provocava resistência cruzada com o indinavir/ ritonavir.

A forma de combate a esse problema tem passado pela utilização de terapias combinadas, muito utilizadas, por exemplo, para o caso do HIV. (Golan et al., 2007).

Este tipo de tratamento baseia-se no facto de existir uma probabilidade muito reduzida dos vírus mutantes serem resistentes a todos os fármacos inseridos nessa combinação.

No caso do HIV, por exemplo, utilizam-se simultaneamente dois inibidores de transcriptase reversa e um inibidor de protease (Bean, 2005).

No entanto, nem sempre a combinação de fármacos atinge os objetivos desejados uma vez que esta combinação resultará inevitavelmente na adição de todos os efeitos secundários inerentes a cada um dos fármacos, provocando um desconforto geral no paciente, levando-o muitas vezes a parar com o tratamento. Com esta paragem, a replicação do vírus reinicia-se devido a uma possível seleção de vírus resistentes às moléculas usadas. Surge desta forma uma nova resistência: a multirresistência que dificultará este tipo de tratamento, esta multirresistência deve a uma acumulação de mutações no vírus em causa. Esta realidade está igualmente patente quando o estado da doença é já muito avançado ou a combinação de fármacos não é suficientemente eficaz.

3) Latência

Uma vez que os antivirais são virustáticos e não virucidas, o uso prolongado destes pode resultar num período de latência do vírus. Este continua deste modo, presente no organismo embora não manifeste qualquer sintomatologia infecciosa. Após paragem do tratamento, o vírus latente retoma a sua replicação (Saxena et al., 2009).

Outro dos problemas com que os investigadores se deparam é com o fato de muitos vírus permanecerem sem qualquer manifestação infecciosa durante longos períodos, sendo que as primeiras manifestações de infeção correspondem a estados já muito evoluídos da doença. Os antivirais não conseguem deste modo atuar de forma preventiva ou nem sempre no início imediato de uma infeção onde a replicação seria mais facilmente controlada (Saxena et al., 2009).

4) Relação Custo/Risco

O estudo e desenvolvimento de antivirais é um processo de elevado custo e de elevado risco.

A Indústria farmacêutica enfrenta alguns desafios uma vez que a grande fatia da despesa nestes processos ocorre quando falham as últimas etapas da investigação como por exemplo o teste em seres humanos. Este processo torna-se portanto dispendioso, demorado, arriscado e nem sempre com a obtenção de resultados desejáveis, o que não alicia propriamente estas indústrias (Saxena et al., 2009).

3. Novos antivirais

Atualmente existem fármacos com potencial antiviral que se encontram ainda em fase de experimentação e que prometem ultrapassar toda uma série de limitações como anteriormente descritas.

Tais fármacos variam desde os antivirais específicos até aos de largo espectro que aparentam ser os mais promissores. Neste capítulo abordar-se-á alguns desses antivirais, com especial incidência sobre os antivirais de largo espectro.

i. Métodos de desenvolvimento dos novos antivirais

A descoberta de um antiviral é um processo complexo que envolve várias etapas, nas quais se recorre a diferentes áreas como a química, a biologia, o metabolismo antiviral e a observação clínica (Flint et al, 2009).

Com o aparecimento da virologia molecular moderna e tecnologias de recombinação de DNA, deixou de ser utilizada a investigação aleatória de procedimentos.

A identificação de um alvo antiviral obriga a uma elevada compreensão das suas propriedades estruturais, moleculares e biológicas (Castel et al.,2009).Para além disso, o desenvolvimento de um possível candidato a antiviral necessita de uma avaliação *in vivo* por forma a compreender as suas propriedades farmacocinéticas, o seu metabolismo e toxicidade (Saxena et al., 2009).

Assim, o desenvolvimento de uma terapia antiviral é um processo longo e complicado que envolve os seguintes passos:

- Identificação de um alvo e seleção de antivirais
- Geração de um protótipo e sua otimização
- Estudos pré clínicos e clínicos
- Registo final do antiviral

Este processo de desenvolvimento ficou bastante facilitado com o aparecimento de novas tecnologias capazes de encurtarem algumas destas fases, que de outra forma seriam ainda mais morosas e complexas (Saxena et al., 2009).

Atualmente, o desenvolvimento de antivirais compreende análises baseadas HTS (Highthroughput screenings) ou seja, métodos que envolvem robótica, processamento

de dados e software de controlo, o que permite a um investigador conduzir milhões de testes químicos, genéticos ou farmacológicos em simultâneo. Através deste processo é possível identificar rapidamente compostos ativos, anticorpos ou genes capazes de modelar uma determinada via molecular (Flint et al., 2009).

O resultado destas experiências fornecem pontos de partida para o design de fármacos e para a compreensão do papel ou interação num determinado processo bioquímico em biologia (Saxena et al., 2009).

Por outro lado, existe ainda o design de fármacos, que consiste num processo de descoberta de novos medicamentos com base no conhecimento de um alvo biológico. Este método envolve uma manipulação de pequenas moléculas que sejam complementares na forma e na carga ao alvo biomolecular, com o qual possam interatuar ligando-se assim a este. Muitas vezes, este planeamento é feito com recurso a técnicas de modelação informática ou, mais concretamente, modelação molecular (Saxena et al., 2009).

Esta modelação permite frequentemente uma visualização tridimensional a qual favorece o estudo e viabilidade de ligação do fármaco.

Na figura abaixo é possível visualizar uma imagem computadorizada deste tipo de modelação.

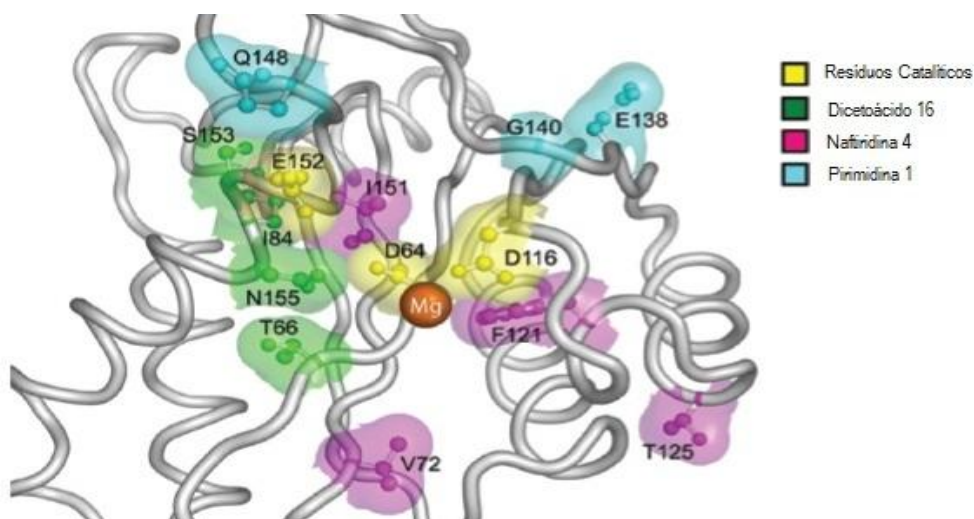


Figura 27- Representação de um modelo de dados de Raio X – HIV Integrase

(retirado de Kazmierski, 2011)

A figura anterior refere-se a uma representação de um modelo de dados de raio X de um sítio ativo de uma HIV integrase. Os resíduos coloridos indicam resíduos encontrados em vírus mutantes. A cor amarela representa os resíduos catalíticos de HIV integrase. A cor verde indica os aminoácidos mutados como resposta a uma incubação prolongada com um inibidor dicetoácido. A cor rosa: aminoácidos mutados como resposta a uma incubação prolongada com um inibidor análogo da naftiridina. Por fim, o azul claro representa os aminoácidos mutados como resposta a uma incubação prolongada com um inibidor análogo da pirimidina (Kazmierski, 2011).

Verifica-se então que os grandes desenvolvimentos nesta área se deram essencialmente na investigação baseada em células, no HTS, na química combinatória e na pesquisa informática.

Na investigação baseada em células, os elementos essenciais de um mecanismo a serem inibidos são montados numa célula apropriada. Este tipo de análises pode fornecer informação não só acerca da inibição da reação no alvo como da citotoxicidade e especificidade. Aqui, são utilizados meios óticos para seguir o movimento da molécula dentro da célula.

No HTS, como referido anteriormente existem mecanismos ou células que permitem testar um grande número de compostos de uma forma automatizada, podendo chegar até aos 10000/dia. Neste método é possível armazenar dados numéricos, mas também capturar imagens das reações das células, podendo assim armazenar e analisar posteriormente esta informação (Flint et al., 2009).

A química combinatória é uma espécie de livraria química a qual fornece aos investigadores de fármacos, acesso a um enorme número de pequenas moléculas sintéticas para investigação. Esta tecnologia fornece todas as combinações possíveis de um conjunto de componentes modulares, fazendo milhares de compostos em poucos dias (Flint et al., 2009).

A pesquisa informática compreende os programas capazes de prever os mecanismos de ação de uma enzima, ajudando o investigador no design de ligações capazes de se ligarem a um sítio catalítico e inibir a função da proteína (Saxena et al., 2009).

Utilizando estas quatro metodologias em simultâneo é possível traçar de forma mais rápida eficaz um protótipo para um novo antiviral, com uma margem mínima para erros.

Bem como a livraria química, que o investigador tem ao seu alcance, apenas a distância de um click o que antigamente demoraria horas e até dias, apenas para a pesquisa. Mediante os desenvolvimentos tecnológicos apresentados e presumindo uma maior evolução no futuro, compreende-se mais facilmente o “salto” dado na investigação da terapêutica antiviral e o avanço que poderá ainda ser conseguido no futuro.

ii. Antivirais específicos

2.1) Fármacos antivirais que atuam no CMV

O citomegalovírus humano continua a ser uma ameaça para os indivíduos imunocomprometidos. Até à data, as drogas comercializadas para o tratamento da infeção por citomegalovírus são os inibidores da DNA polimerase. Embora estes fármacos sejam eficazes, existem vários inconvenientes associados a sua utilização, incluindo a toxicidade e resistência adquirida por estes vírus (Lischka et al., 2010; Heidelberger, 1975).

O estudo de fármacos antivirais para o CMV surgiu pela necessidade de controlo desta infeção oportunista nos pacientes com HIV (Vadlapudi et al., 2011).

No caso do CMV, a complicação mais recorrente é a retinite, uma inflamação da retina do olho que pode mesmo levar a perda de visão. Estes vírus pertencem à família Herpesviridae, estes vírus são classificados como de cadeia dupla de DNA (Oliveira, et al., 2011).

Tal como noutras infeções virais, a infeção primária do CMV é seguido de um período de latência. O vírus reativa-se quando o sistema imunitário se encontra severamente comprometido, ou seja, em indivíduos com HIV, transplantados, recém-nascidos e indivíduos sob o uso de medicamentos imunossuppressores (Oliveira, et al., 2011).

Neste sentido foram desenvolvidos os seguintes fármacos cujo os mecanismos de ação e vantagens se encontram sintetizados na tabela (Vadlapudi et al., 2011)

Tabela 1: Novos antivirais contra o Citomegalovírus (adaptado de Valdaperdi, 2011).

Novas drogas contra o citomegalovírus	Mecanismo de Ação	Vantagens
Maribavir	Interferem na saída do nucleocapsídeo viral do núcleo da célula infectada	Mecanismo ação diferente reduz a resistência cruzada associado com as drogas
Bay 38-4766	Inibidores da maturação do DNA	Diminuição das mutações nos genes UL89 e UL56 responsáveis pelo desenvolvimento das resistências aos fármacos
Ésteres cidofovir	Inibidores da síntese DNA viral	Melhoria significativa da biodisponibilidade oral (88-97%) sem qualquer toxicidade renal
Ribosídeos de benzimidazole	Bloqueia a clivagem e o empacotamento do genoma viral	Novo mecanismo de ação confere eficácia contra estirpes resistentes aos fármacos
Análogos de ciclopropavir e metilenociclopropano	Inibidores da síntese do DNA viral e da atividade normal da quinase UL 97	Mantém atividade contra ganciclovir- resistentes e isolados clínicos
AIC246	Bloqueia a clivagem e o empacotamento do genoma viral	Atividade antiviral excelente contra isolados clínicos por CMV (Citomegalovírus)

iii. Antivirais de Largo Espectro

Os antivirais de largo espectro são grande promessa futura contra a maior parte das infecções virais existentes. Os antivirais de largo espectro tem atividade antiviral contra o vírus de DNA e RNA. Os antivirais de largo espectro que existem atualmente são a Ribavirina e o Interferão, os antivirais deste grupo atualmente estudados e que vão ser abordados neste trabalho científico são o DRACO e o LJ001.

O interferão quando descoberto no ano 1950, foi intitulado como uma “Droga maravilhosa”, isto porque o interferão faz com que a célula infetada imita um sinal de alerta para as outras células não infetadas permitindo que estas ativem as suas defesas naturais (por exemplo segregação da proteína PKR). A droga também ativa o sistema imunitário, que envia glóbulos brancos para imunizar a infeção. Atualmente o interferão é utilizado para combater doenças graves, como o vírus da hepatite C (Arosa et al., 2012; Jacob, 2006).

A ribavirina é um análogo sintético nucleosídeo da guanina e da inosina. A Ribavirina foi sintetizada pela primeira vez em 1972 por Sidwell. Era suposto ter uma atividade de amplo espectro contra muitos vírus de DNA e RNA, no entanto, é relativamente tóxica e seu desenvolvimento e indicações de uso tem sido controversos. Exibe atividade antiviral contra HSV, HCV e HIV, adenovírus, poxvírus, paramixovírus, arenavírus (febres hemorrágicas, febre de lassa) e influenza. A ribavirina é usada em combinação com o interferão- α no tratamento de infeções por HCV. Mais de 30 anos decorridos desde a sua descoberta o seu mecanismo de ação permanece controverso (Cummings et al., 2001; Cooper et al., 2003).

Alguns estudos demonstram que a atividade antiviral da ribavirina está relacionada diretamente com a sua atividade mutagénica. Mesmo com o seu mecanismo desconhecido e alguma toxicidade, a ribavirina é utilizada no tratamento da infeção pelo vírus da hepatite C crónica em adultos, crianças com idade igual ou superior a 3 anos e só deve ser utilizado no âmbito de um regime terapêutico combinado com o interferão. Ribavirina não deve ser utilizado em monoterapia. A ribavirina também é utilizada no tratamento de infeções mais esporádicas por exemplo na infeção do vírus da febre da lassa e infeções por hantavírus. A virmidina e levovirina são análogos da ribavirina que estão em desenvolvimento clínico no tratamento do HCV (Crotty et al.; 2000).

O DRACO é um fármaco de largo espectro de ação recentemente apresentado, de todas as abordagens em relação a este grupo de fármacos o Draco é o que desperta maior entusiasmo e maior crítica a nível da comunidade científica. Tal com o interferão o DRACO é uma proteína com potencial para provocar uma resposta imunológica. O seu modo de ação bem como os seus resultados experimentais serão abordados posteriormente (Rider, 2011).

O LJ001 é um fármaco de largo espectro de ação, este apenas atua em vírus com envólucro, apesar de existir esta restrição, este continua a ser um antiviral de largo espectro pois engloba uma grande parte dos vírus existentes (Wolf et al., 2009).

Como se pode analisar ao longo dos anos tem havido um crescente estudo sobre este grupo de antivirais, pois estes fármacos permitem atuar em qualquer tipo de vírus com probabilidade de eficácia garantida e também irá permitir intervir mais rapidamente no tratamento dos doentes.

3.1) DRACO

Atualmente existem relativamente poucos agentes terapêuticos eficazes contra determinadas infeções virais, e os que existem são altamente específicos para o vírus em questão. Numa tentativa de contrariar esta tendência têm surgido moléculas com aplicação de largo espectro, entre elas o DRACO, um fármaco antiviral de largo espectro de ação. DRACO (**D** double-stranded **R**NA **A**ctivated **C**aspase **O**ligomerizer) é um grupo de drogas antivirais em desenvolvimento no Instituto de Tecnologia de Massachusetts. O DRACO é uma proteína quimérica que possui dois domínios. Um domínio que se liga ao dsRNA viral (através da via do interferão) e um segundo domínio (através da ativação das caspases) que induz a apoptose, desta forma o DRACO combina dois processos de atuação, o que vai aumentar a sua eficácia antiviral e diminuir possíveis resistências (Rider, 2011). Na terapêutica atual o que é sugerido, é a combinação de vários fármacos de diferentes grupos de forma atuar em distintos pontos do ciclo viral, mas isto não é tão simples porque os efeitos secundários vão ser somados na totalidade, podendo provocar ao doente um efeito não desejado (Feng., et al 2009). Por isso surge o DRACO que combina dois processos em simultâneo sendo altamente eficaz e diminuindo assim possíveis resistências (Rider, 2011).



Figura 28- Draco. Retirada de Biomedicine Update: Are We About to Slay Viruses Forever?. Em linha. Disponível em <<http://www.21stcentech.com/biomedicine-update-slay-viruses-forever/>> [Consultado em Outubro 2012]

O DRACO foi desenvolvido para induzir rapidamente o processo de apoptose em células infectadas, ou seja, tem uma elevada seletividade para células infectadas em detrimento das células não infectadas. A seletividade desta molécula é conseguida devido ao comprimento e tipo de hélices de transcrição de RNA presentes no interior de células infectadas e não infectadas. A maioria dos vírus produz hélices longas de dsRNA durante os processos de replicação e transcrição. Ao contrário das células dos mamíferos não infectadas regra geral produzem menos de 24 pares de bases durante a transcrição, desta forma o DRACO consegue distinguir uma célula infectada de uma não infectada, induzindo apenas a morte celular nas células infectadas. Estudos feitos demonstraram que o DRACO é eficaz contra 15 tipos de vírus e não é tóxico em 11 tipos de células de mamíferos, como se pode verificar nas tabelas 2 e 3, respetivamente (Rider, 2011).

Tabela 2: Vírus utilizados para testar a eficácia de Draco (adaptado de Rider, 2011).

Vírus	Família	Genoma	Invólucro	Espécie
Rinovírus 1B	Picornavírus	+ssRNA	Não	Humano
Rinovirus 2	Picornavírus	+ssRNA	Não	Humano
Rinovirus 14	Picornavírus	+ssRNA	Não	Humano
Rinovirus 30	Picornavírus	+ssRNA	Não	Humano
Encéfalo mielite de Theiler's	Picornavírus	+ssRNA	Não	Rato
Dengue tipo 2	Flavivírus	+ssRNA	Não	Humano
Influenza H1N1 A/PR/8/34	Orthomy Xovírus	-ssRNA	Sim	Humano
Influenza H1N1 A/W5/33	Orthomy Xovírus	-ssRNA	Sim	Humano
Tacaribe	Arenavírus	-ssRNA	Sim	Morcego
Amapari	Arenavírus	-ssRNA	Sim	Roedor
Guama Be Ar	Bunyavírus	-ssRNA	Sim	Roedor
Guama Be Ar	Bunyavírus	-ssRNA	Sim	Roedor
Reovírus 3	Reovírus	dsRNA	Não	Humano
Adenovírus 5	Adenovírus	dsDNA	Não	Humano
Murine	Adenovírus	dsDNA	Não	Rato

Tabela 3: Células utilizadas no estudo – Draco (adaptado de Rider, 2011).

Células	Tecidos	Vírus
Fibroblastos	Pulmão	Rino 1B, 2, 30; Flu 33, 34
Hepatocitos	Fígado	Rino 1B, 2, 30; Flu 33, 34
Células epiteliais do tecido respiratório	Traquéia	Flu A/PR/8/34
Osteoblastos	Ossos	Rino 1B, 2, 30; Flu 33, 34
Células	Coração	Rino 1B, 2, 14, 30; Flu 33, 34
AD 293	Rim	Adeno 5
Células Hela	Nuca	Rino 14
Células Vero	Rim	Amapari, Tacaribe, Guama, Dengue
L 929	Fibroblastos	Encéfalo, Madeno, Reo 3
BALB/3T3	Fibroblastos	Reo 3
NIH/ 3T3	Fibroblastos	Encéfalo mielite

Maioritariamente os vírus tem dupla ou simples cadeia de RNA no seu genoma e produzem longas hélices dsRNA durante a transcrição e replicação. Os restantes vírus tem DNA no seu genoma e tipicamente produzem hélices longas dsRNA via transcrição simétrica (ambas as cadeias da molécula de DNA são utilizadas como molde para formação de RNA). Em contraste e como já foi referido as células de mamíferos não infetadas geralmente não produzem longas hélices dsRNA (21 -23 pares de bases). As defesas naturais exploram esta diferença de forma a detetar e a eliminar as infeções virais (Rider, 2011; Bray, 2008).

Como já foi referido o DRACO possui dois domínios de atuação diferente. O primeiro processo envolve a deteção dsRNA pela via do interferão. Os interferões são glicoproteínas naturais produzidas pelo sistema imunitário em resposta a ameaça de agentes como vírus, bactérias, parasitas e tumores (Razonable, 2011).

Os interferões fazem parte da imunidade inata, mas estes só atuam depois da entrada do patogénio na célula (Arosa et al., 2012).

Existem 2 tipos de interferões, que incluem 3 classes principais:

- Interferão α e Interferão β (Tipo I);
- Interferão γ (Tipo II);

A função dos interferões é inibir a replicação dos vírus em células infetadas, evitando a propagação do vírus a outras células e aumentando também atividade de certas células do sistema imunitário, tais como linfócitos T, linfócitos B e macrófagos (Arosa et al., 2012).

Quando as células possuem elevadas concentrações de dsRNA, é emitido uma espécie de sinal, aumentando a produção de interferão, ou seja, o gene que codifica esta citocina é ativado nas células infetadas e liberta interferão para as células circundantes como se pode visualizar na imagem referente a via do interferão. As células circundantes não infetadas iniciam a produção de grandes quantidades da proteína PKR (Proteína Kinase R). Quando vírus infeta uma célula já pré- sinalizada pelo interferão, esta já está pronta imunizar o vírus, devido a ação da PKR (Bennett et al., 2012).

A proteína quinase R (PKR) contém dois domínios um N-terminal e C-terminal, a ligação de múltiplas proteínas PKR ao dsRNA viral, ativa as PKRs via autofosforilação. A proteína PKR ativada fosforilada, inibe a tradução viral de proteínas. Todos os RNA dentro da célula são degradados, impedindo o RNAm de ser traduzido, e assim impedindo a replicação do vírus. O DRACO sendo uma proteína quimérica contém um domínio que se vai ligar ao dsRNA viral, por um processo semelhante ao da proteína PKR, não descrito até momento (Rider, 2011).

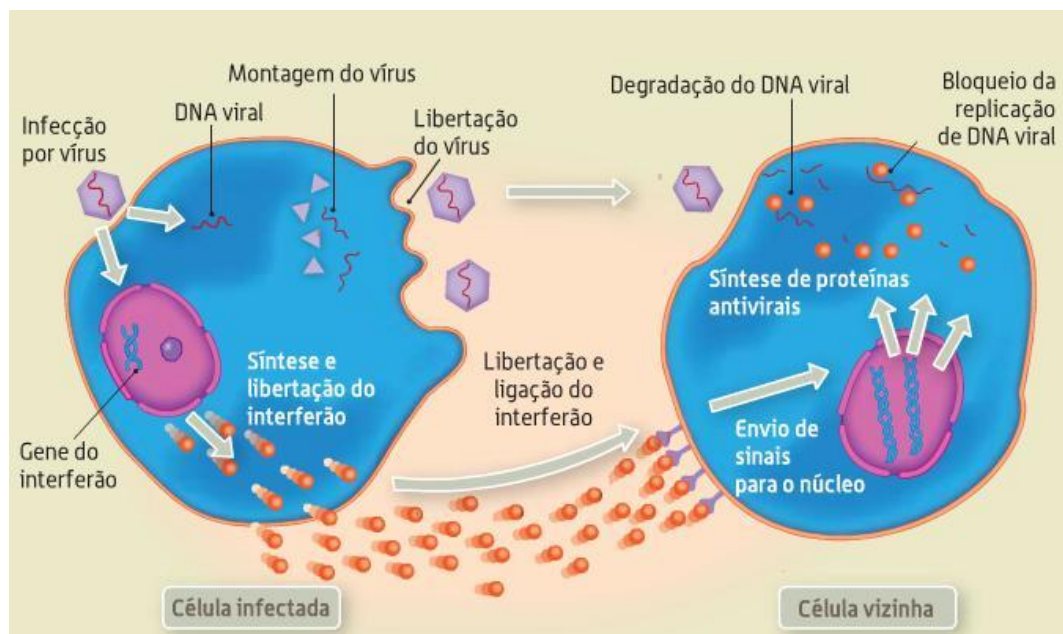


Figura 29 - Via do Interferão. Retirado de Imunidade e Controle de doenças Em linha. Disponível em <<http://biologia12eportefolio.blogspot.pt/p/imunidade-e-controlo-de-doencas.html>> [Consultado em Setembro 2012].

O segundo processo utilizado pelo DRACO é a via da apoptose, o DRACO como já foi referido é uma proteína quimérica que possui um segundo domínio de ligação a procaspases, ativando desta forma a via de apoptose. A maquinaria intracelular apoptótica é semelhante em todas as células animais (Cohen, 1997). Nesta via são utilizadas caspases, que pertencem a família das proteases, responsáveis pela ocorrência da degradação celular característica da apoptose (Alberts *et al.*, 2004).

Até aos dias de hoje apenas foram descritas 14 caspases em células de mamíferos que normalmente estão presentes nas células numa forma inativa até que sejam ativadas por um determinado estímulo. As caspases envolvidas na apoptose dividem-se em duas classes: a classe I composta pelas caspases iniciadoras (caspase -2 -8 -9 -10) e a classe II das caspases efectoras (Alberts *et al.*, 2004; Shearwin-Whyatt e Kumar, 1999).

As caspases são proteases com um resíduo de cisteína (pertencem ao grupo de proteases de cisteína) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. O nome “caspase” é derivado desta função molecular “Cysteine-aspartic-acid-proteases”. São produzidas como precursores inativos designados de procaspases, os quais são, por sua vez, ativados pela clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem à morte celular programada. As proteases ativas clivam outras

proteínas-chave na célula, a atividade das procaspases é especificamente regulada na célula para garantir um controlo apertado da PCD (Morte celular programada) (Alberts *et al.*, 2004; Cohen, 1997).

A via intracelular é ativada, em resposta a um determinado estímulo, induzindo na mitocôndria alterações estruturais e bioquímicas, havendo libertação de fatores pró-apoptóticos (por exemplo: factor indutor da apoptose). (Twomey e McCarthy, 2005; Vaux and Korsmeuer, 1999)..

Este fatores pró-apoptóticos contém moléculas de sinalização intracelular de apoptose, tais como o fator de ativação de protease apoptótico 1 (Apaf-1), o cyt *c* um fator citosólico e procaspase-9. A formação deste complexo na presença de adenosina trifosfato (ATP) resulta na ativação da caspase-9 e, subsequentemente, de uma cascata de caspases, levando então a morte celular programada - apoptose (Alberts *et al.*, 2004).

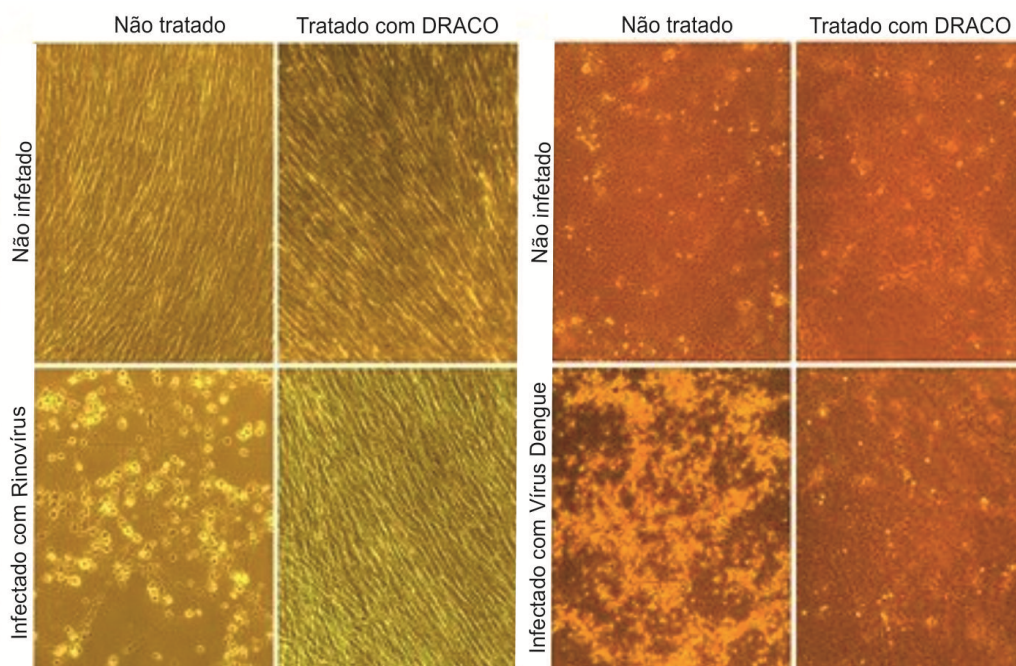


Figura 30 - Imagens de microscópico que demonstram a eficácia do Draco contra o rinovírus e dengue.

Adaptado de New drug could cure nearly any viral infection Em linha. Disponível em <<http://web.mit.edu/newsoffice/2011/antiviral-0810.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

As imagens da figura 25 comprovam a eficácia do DRACO, uma vez que não se observa qualquer efeito citopático após o tratamento (Rider, 2011).

Do lado esquerdo da imagem referente ao vírus rinovírus, este mata as células humanas quando não tratado com o DRACO, verificando-se como efeitos citopáticos a degeneração celular e perda de adesão à lâmina. Depois verifica-se o tratamento das células infetadas com Rinovírus após o tratamento com DRACO, utilizando para verificação de resultados a imagem com as células não infetadas.

O propósito de administrar o DRACO as células não infetadas, teve como intuito de demonstrar que o DRACO não tem nenhuma toxicidade em células não infetadas, ou seja, este tem a capacidade de seletividade entre células infetadas e não infetadas este é sem dúvida um dos grandes passos de evolução futura nos antivirais (Rider, 2011).

A imagem do lado direito é referente ao vírus Dengue, em que processo de leitura de resultados é igual ao rinovírus, a única diferença é que foram usadas para este vírus células de macaco (Células Vero).

Contudo ainda serão necessários ensaios mais extensos para determinar quanto tempo depois da infecção o DRACO pode ser utilizado com sucesso e se tem alguma utilidade contra infecções crônicas, sem produzir níveis inaceitáveis de morte celular in vivo. (Rider, 2011).

3.2) LJ001

O LJ001 é uma pequena molécula antiviral derivada da rodamina metileno arilo que se verifica ser eficaz apenas contra vírus com invólucro incluindo Influenza A, filovírus, poxvírus, arenavírus, bunyaviruses, paramixovírus, flavivírus e HIV-1 (Wolf et al., 2009; Palese, 2009). Já em vírus sem invólucro como por exemplo o Adenovírus e Reovírus o composto não teve qualquer efeito.

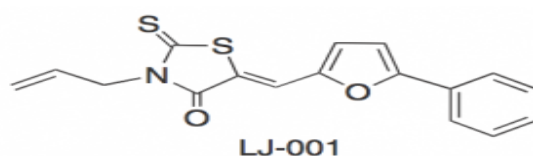


Figura 31 - Antiviral de largo espectro - LJ001-Retirado de An viral for enveloped viroses Em linha. Disponível em <<http://www.virology.ws/2010/02/18/an-antiviral-for-enveloped-viruses/>> Consultado em [Outubro de 2012]

O LJ001 é especificamente intercalado entre membrana viral e a membrana celular, inativando a entrada do vírus momentos após etapa de ligação do vírus, mas antes da fusão do vírus com a célula. Embora a membrana da célula hospedeira também fique danificada, esta possui a capacidade de regeneração ao contrário da membrana viral. A sua especificidade para as membranas lipídicas, verifica-se devido a sua estrutura antipática (possui uma extremidade polar e outra apolar) (Wolf et al., 2009).

Resumindo, os dados revelam um grupo de antivirais de largo espectro eficazes contra vírus com invólucro tendo como alvo as membranas lipídicas, comprometendo a capacidade de mediar a fusão vírus-célula (Wolf et al., 2009).

Tabela 4: LJ001- Capacidade de inibição sobre vírus com e sem invólucro (retirado de Wolf et al., 2009).

Marburg _L (cat A)	Filoviridae	ssRNA(-)	Y	++
Influenza A _L (cat A)	Orthomyxoviridae	ssRNA(-)	Y	+++
Junin _L (cat A)	Arenaviridae	ssRNA(-)	Y	++
Rift Valley fever _L (cat	Bunyaviridae	ssRNA(-)	Y	+++
LaCrosse _L (cat B)	Bunyaviridae	ssRNA(-)	Y	+++
Nipah _{L,P} (cat C)	Paramyxoviridae	ssRNA(-)	Y	++
Omsk hemorrhagic	Flaviviridae	ssRNA(+)	Y	++
RSSE _L (cat C)	Flaviviridae	ssRNA(+)	Y	++
PIV-5 _L	Paramyxoviridae	ssRNA(-)	Y	++
HPIV-3 _L	Paramyxoviridae	ssRNA(-)	Y	++
Newcastle disease _L *	Paramyxoviridae	ssRNA(-)	Y	++
HIV-1 _{L,P} *	Retroviridae	ssRNA(-)RT	Y	++
Murine leukemia _L	Retroviridae	ssRNA(-)RT	Y	++
Yellow fever _L	Flaviviridae	ssRNA(+)	Y	+++
Hepatitis C _L	Flaviviridae	ssRNA(+)	Y	+++
West Nile _L	Flaviviridae	ssRNA(+)	Y	+++
Vesicular stomatitis _{L,P}	Rhabdoviridae	ssRNA(-)	Y	++
Cowpox _L	Poxviridae	dsDNA	Y	+
Vaccinia _L	Poxviridae	dsDNA	Y	++
Adenovirus _L **	Adenoviridae	dsDNA	N	-
Coxsackie B _L **	Picornaviridae	ssRNA(+)	N	-
Reovirus _L	Reoviridae	dsDNA	N	-

Conclusão

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, cujos genomas (DNA ou RNA) se replicam no interior de células vivas, usando a maquinaria sintética celular. São constituídos por uma zona central denominada nucleóide, constituído por DNA e/ou RNA, sendo este revestido pela cápside de origem proteica. Alguns viriões ainda possuem um invólucro, derivado da membrana celular.

Vírus e doenças virais têm estado no centro da ciência, sendo que alguns dos nossos maiores desafios e conquistas envolveram a virologia. Com o aumento da incidência de várias patologias causadas por vírus, e com o aumento do impacto socioeconómico houve a necessidade de pesquisar e desenvolver novos agentes antivirais. Apesar da necessidade de formular antivirais eficazes, estes continuam a ser produzidos numa quantidade inferior ao desejado. Esta baixa produtividade deve-se principalmente à dificuldade dos investigadores ultrapassarem certas limitações, como a toxicidade, latência viral e possíveis resistências associadas aos antivirais. Apesar destas dificuldades, o conjunto de fármacos disponíveis para combater os vírus tendo sido de inestimável utilidade para salvar milhões de vidas a cada ano e melhorar a qualidade de vida de incontáveis pacientes acometidos de doenças virais como é o caso do HIV. Para além do uso dos antivirais no tratamento das infeções virais, estão disponíveis ainda as vacinas profiláticas, usadas como uma medida preventiva de saúde pública.

A falha nos ensaios clínicos em humanos também surge como uma grande limitação no desenvolvimento dos antivirais, pois mesmo executando ensaios *in vivo* em animais esses resultados não podem ser transportados diretamente para os humanos. Temos como exemplo o DRACO, fármaco de largo espectro abordado neste trabalho científico. Teve a sua capacidade antiviral avaliada em ratinhos, apresentando resultados bastante satisfatórios, pois o seu efeito antiviral apenas atinge as células infetadas, enquanto às células não infetadas mantêm-se intatas sem qualquer tipo de efeito tóxico associado.

Como já foi referido o desenvolvimento e a pesquisa de novos antivirais são um processo demorado e caro. A falta de sucesso deve-se muitas vezes ao fato das moléculas antivirais interferirem não só com a replicação dos vírus bem como afetarem negativamente a célula hospedeira, uma vez que o ciclo viral está intimamente ligado as funções celulares. Um dos problemas com a produção de substâncias antivirais está na rápida dinâmica das infeções virais, que muitas vezes por falha de diagnósticos rápidos,

torna obsoletos os próprios tratamentos que pecam por ser tardios. Esta falha poderá ser futuramente ultrapassada com o uso de técnicas rápidas como a biologia molecular, ou técnicas mais recentes como a neutrografia.

Os vírus sofrem replicação intracelular, utilizando os mecanismos da célula hospedeira, o modo de replicação intracelular diminui o número de alvos potenciais para os fármacos antivirais. Os agentes antivirais exploram as diferenças existentes entre as estruturas e funções das proteínas virais e humanas para obter uma seletividade de ação antiviral. Neste trabalho científico, foram abordados duas classes de fármacos importantes, os fármacos específicos e fármacos de largo espectro. Os fármacos específicos atuam seletivamente sobre um tipo de vírus, por outro lado os fármacos de largo espectro atuam numa maior diversidade de vírus.

Os fármacos específicos abordados neste trabalho são antivirais que atuam no citomegalovírus. O citomegalovírus humano continua a ser uma ameaça para os indivíduos imunocomprometidos. Até à data, as drogas comercializadas para o tratamento da infecção por citomegalovírus são os inibidores da DNA polimerase (Ganciclovir). Embora estes fármacos sejam eficazes, existem alguns inconvenientes como a toxicidade e resistência adquirida por estes vírus. O estudo de fármacos antivirais para o CMV surge pela necessidade de controlo desta infecção oportunista nos pacientes com HIV. Neste trabalho foram abordados os seguintes fármacos: maribavir, bay 38-4766, ésteres cidofovir, ribosídeos de benzimidazole, análogos de ciclopropavir e metilenociclopropano e AIC246. Estes antivirais atuam no ciclo viral, bloqueiam por exemplo a síntese do DNA viral, bloqueiam a clivagem e o empacotamento do genoma viral, estes são apenas alguns alvos de atuação dos antivirais específicos para o citomegalovírus.

Em relação aos fármacos antivirais de largo espectro foram pesquisados neste trabalho o DRACO e LJ001. O DRACO é um antiviral de largo espectro que ainda se encontra em fase de estudo, este atua por dois mecanismos de ação distintos: um domínio que se liga ao dsRNA viral (através da via do interferão) e um segundo domínio (através da ativação das caspases) que induz a apoptose, assim com dois mecanismos conjugados, a sua eficácia antiviral será maior e poderá diminuir possíveis resistências. Até ao momento apenas foi divulgado que irão ser iniciados testes em macacos e começando

obter resultados promissores. Rider espera licenciar a tecnologia para testes em animais maiores e para eventuais testes clínicos em humanos.

O LJ001 é um fármaco antiviral de largo espectro que apenas atua em vírus que tem invólucro. O LJ001 é especificamente intercalado entre a membrana viral e membrana celular, inativando a entrada do vírus momentos após etapa de ligação do vírus, mas antes da fusão do vírus com a célula. O LJ001 também ainda se encontra na fase dos testes clínicos.

De um modo geral, a análise pormenorizada da literatura bibliográfica permitiu-me concluir que a terapia antiviral ainda se encontra numa fase ascensão científica. Para que este progresso seja alcançado vários parâmetros tem de ser correlacionados e estudados. Parâmetros estes como a prevenção, epidemiologia, diagnóstico, uso de antivirais de largo espectro e identificação no ciclo viral de novos alvos de atuação.

A prevenção é uma das medidas de controlo das infeções virais. Como medidas de prevenção destacam-se a vacinação, eliminação do vetor, veiculação da informação para a população, quarentena, entre outras. A vacinação representa a medida mais eficaz porque torna o indivíduo resistente a infeção.

A epidemiologia é uma ciência que estuda as doenças na população, investiga os fatores envolvidos na transmissão das infeções, a sua dinâmica e distribuição. Existem infeções virais que são mantidas na população por uma cadeia sucessiva de infeções agudas entre hospedeiros de uma única espécie animal e outras infetam várias espécies de hospedeiros. Assim através da epidemiologia é possível determinar a frequência e distribuição das doenças virais, conhecendo os fatores responsáveis pela infeção e adotando medidas de prevenção.

O diagnóstico das infeções virais emergiu nas últimas décadas como uma importante ferramenta em medicina, contribuindo de forma efetiva na identificação do patogénico, direcionando o tratamento da doença. Assim através de técnicas de diagnósticos (Ex: biologia molecular) é possível identificar o vírus responsável pela infeção, sendo desta forma um parâmetro de extrema relevância.

Por fim em relação ao tratamento das infeções virais, se todos os ensaios clínicos forem ultrapassados estarão futuramente disponíveis mais fármacos de largo espectro de ação e

também surgirão mais pesquisas/investigações com intuito de identificar novos alvos de atuação a fim diminuir as resistências existentes e a toxicidade.

Bibliografia

Artigos científicos:

Al-ahdal, Mohammed N., Al-Qahtani, Ahmed A., Rubino, Salvatore (2012). Coronavirus respiratory illness in Saudi Arabia. *Department of infection and immunity*, 6(10), pp. 692-694.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (2004). *Biologia Molecular da Célula*, pp.983-1026.

Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes, *Bacteriological Reviews*, 35, pp. 235-241.

Bean, P. (2005). New drug Targets for HIV, *Clinical Infections Diseases*, 41, pp. 95-100.

Beigel, J. e Bray, M. (2008). Current and Future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza, *National Institutes of Health*, 78 (1), pp. 91-102.

Bennett, Richard L., Carruthers, Aubrey L., Hui, Teng, Kerney, Krystal R. Kerney, Liu, Xiangfei e May, W. (2012). Increased Expression of the dsRNA – Activated Protein Kinase PKR in Breast Cancer Promotes Sensivity to Doxovubicin. *Department of Medicine, Division of Hematology and Oncology*, Volume 7.

Boheemen, Sander Van, Graaf, Miranda, Lauber, Chris (2012). Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *ASM Journal*. Pp. 1-9.

Bray, Mike (2008). Antiviral Research to Highly Pathogenic RNA Viral Infections: challenges for antiviral Research. Integrated Research Facility, *Division of Clinical research*, pp. 1-8.

Castel, Guillaume e Tordo, N. (2009). Nouvelles stratégies pour la Conception de molécules antivirales, *Revue Francophone des Laboratoires*, pp. 91 – 100.

Chung, Michael (2011). Antiretroviral adherence interventions: what works and what does not work. *Departments of global Health, Medicine and Epidemiology*, pp. 1263 – 1265.

Clercq, E. (2004). Antivirals and antiviral strategies, *Natural Review Microbiology*, 2, pp. 704-720.

Cohen, G.M. (1997). Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death, *Pharmacology and Therapeutics*, 75, pp.153-177.

Cooper, A., Banasiak, N., e Allen, P. (2003). Management and prevention strategies for respiratory syncytial virus (RSV) Bronchiolitis in infants and young children: a review of evidence-based practice interventions, *Pediatric Nursing*, 29, pp. 452-456

Crotty, S., Magg, D., e Arnold, J. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirina is an RNA virus mutagen, *Nature Medicine*, 6(12), pp. 1375-1379

Cummings, k., Lee, S., e West, E. (2001). Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: a meta-analyses of randomized trials, *Jama*, 285(2), pp. 193-199.

Dias, Francisco Javier (2000). Terapia de la Enfermedad Viral – Princípios de Virologia, pp. 161-177.

Dieterich, T. Robinson, A., Love, J. e Stern, O. (2004). Drug-induced liver injury associated with the use of nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors, *Clinical Infections Diseases*, 38, pp. 80-89.

Elion G. (1986). Acyclovir: discovery, mechanisms of action, and selectivity, *Journal Medicine of Virology*, 1, pp. 2-6.

Elion, G. (1986). History, mechanisms of action spectrum and selectivity of nucleose analogs, In: Mills, J. e Corey, L. (Ed.). *Antiviral Chemotherapy: New Directions for Clinical Application and Research*. New York, Elsevier Science Publishing, pp. 118-137.

Enomoto, L. Anderson, P., Li, S., Edelstein, C. e Weinberg, A. (2010). Effect of Nucleoside and Nucleotide Analog Reverse Transcriptase Inhibitors on Cell-Mediated Immune Functions, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 26(11), pp. 1-9.

Enquist, L. (2009). Virology in the 21st Century, *Journal of Virology*, 83(11), pp. 5296-5308.

Feng, J., Ly, K., Myrick, F., Goodman, D., White, K., Svarovskaia, E., Esoda, K. e Miller, M. (2009). The triple combination of tenofovir, emtricitabine and efavirenz shows synergistic anti-HIV-I activity in vitro: a mechanism of action study, *Retrovirology*, 6(44), pp. 1-16.

Ferraris, O., Escuret, V., Bouscambert-Duchamp, M., Lina, B. e Morfin, F. (2010). Intérêtes des inhibiteurs de la neuraminidase dans la prise en charge des infections dues aux virus influenza, *Elsevier Masson*, 58, pp. 69-78.

Field, H. e Clercq, E. (2004). Antiviral Drugs – a short history of their discovery and development, *Microbiology Today*, 31, pp. 58-61.

Field, Hugh J., Wainberg, Mark A. (2011). Antiviral Drug Development. *Department of veterinary Medicine, University of Cambridge*, pp. 545 – 547.

Flanagan, Meg L., Leighton, Terrance J. e Dudley, Joseph P. (2011). Anticipating Viral Species Jumps: Bioinformatics & Data Needs, *DTRA/ SCC-WMP*, pp. 1 – 26.

Flexner, C. (1998). HIV – Protease inhibitor, *New England Journal of Medicine*, 338, pp. 1281-1293.

Floresm Eduardo Furtado, Weiblen, Rudi (2009). O vírus do Nilo Ocidental. *Ciência Rural, Santa Maria*. Pp. 604-612.

Fredericksen, L., Wei, L., Yao, J., Luo, T. e Garcia, V. (2002). Inhibition endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus, *Journal of Virology*, 76(22), pp. 11440-11446.

Graci, J. e Cameron, C. (2005). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viroses, *Reviews in Medical Virology*, 16, pp. 37-48.

Griffiths, P. (2009). A perspective on antiviral resistance, *Journal of Clinical Virology*, 46, pp. 3-8.

Heidelberger, C. (1975). On the mechanism of the antiviral activity of trifluorothymidine, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 255, pp. 317-325.

Jackson, R., Cooper, K., Tappenden, P., Rees, A., Simpson, E., Read, R. e Nicholson, K. (2010). Oseltamavir, zanamivir and amantadine in the prevention of influenza: A systematic Review, *Elsevier*, pp. 1-12.

Jacob, H. (2006). Interferon and heparin sulphate, *Biochemical Society Transactions*, 34, pp. 461-464

Kahn, J., Lagakos, S. e Wulfsohn, M. (1999). Efficacy and safety of adenofovir dipivoxil with antiretroviral therapy: a randomized controlled trial, *Jama*, 282, pp. 2305-2312.

Lalezari, P., Friedberg, N. e Bisset J. (2002). High dose oral ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinitis, *Journal of Clinical Virology*, 24, pp. 67-77.

Lischka, Peter, Hewlett, Guy, Wunberg, Tobias, Baumeister, Judith, Paulsen, Daniela, Goldner Thomas, Ruebsamen-schaeff, Helga e Zimmermann Holger (2010). In vitro and in vivo Activities of the Novel Anticytomegalovirus Compound ALC 246, pp. 1290-1297.

Martinazzo, Angela Gasperin, Noletto, Dario, Nunes, Myllene Priscila Muller, Sousa, Telma Tavares Richa (2008). Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV. *Secretaria de Vigilância e Saúde*, pp. 8-123.

Métifiot, M., Marchand, C., Maddali, K. e Pommier, Y. (2010). Resistance to integrase inhibitors, *Viruses*, 2, pp. 1347-1366.

Moore, J. e Dams, R. (2003). The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine, *PNAS*, 100(10), pp. 598-1060.

Nicholson, G., Wood, M. e Zambon, M. (2003). Influenza, *Lancet*, 362, pp. 1733-1745.

Oliveira, Felipe, Braga, António, Capelo, Alessandra, Rezende, Jorge e Montenegro, Carlos (2011). Infecção pelo citomegalovírus na gestão: uma visão atual. pp. 516 – 519.

Palese, Peter (2009). A Broad-Spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. Mount Sinai School Of Medicine, pp. 1-6.

Razonable, R. (2011). Antiviral Drugs for Viruses than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clin Proc*, 86(10), pp.1009-1026.

Rider, Todd H., Zook, Christina E., Boettcher, Tara L., Wick, Scott T., Pancoast, Jennifer S. e Zusman, Benjamin D. (2011). Broad Spectrum Antiviral Therapeutics. *Institute of Technology*, volume 7.

Saxena, Shailendra K., Mishra, Niraj e Saxena, Rakhi (2009). Advances in antiviral drug discovery and development. Part I – advancements in antiviral drug discovery. *Centre of cellular and molecular biology*, pp. 101 – 107.

Saxena, Shailendra K., Mishra, Niraj e Saxena, Rakhi (2009). Advances in antiviral drug discovery and development. Part II – Advancements in antiviral drug development. *Centre of cellular and molecular biology*, pp. 209 – 215.

Shearwin-Whyatt, L.M., Kumar, S. (1999). Caspases in developmental cell death. *IUBMB Life*, 48(2), pp.143-150.

Simoni, Isabela (2003). Tratamentos Antivirais. Instituto Biológico. *Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal* (65), pp. 41-44.

Snoeck, R., Andrei, G. e Clercq, E. (2001). Cidofovir in the treatment of HPV – associated lesions, *Verh K Acad Geneesk Belg*, 63, pp. 93-122.

Temesgen, Z. e Siraj, Dawd S. (2008). Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor. *Mayo Clinic and Foundation, Division of Infectious Diseases*, pp. 493 – 500.

Twomey, C., McCarthy J.V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med*, 9(2), pp.345-359.

Vadlapudi, Aswani D., Vadlapatla, Ramya K. e Mitra, Ashim K.(2012). Current and Emerging Antivirals for the Treatment of Cytomegalovirus (CMV) Retinitis: an update on Recent Paterns. *Division of Pharmaceutical Sciences*, pp. 7 – 18.

Vaux, D.L., Korsmeyer S.J. (1999). Cell death in development. *Cell*, 96(2), pp.245-254.

Wacha, R., Silva, A. X., Crispim, V. R., Couceiro, J. N. S. S. (2011). Verificação da viabilidade da deteção de virions através da análise por ativação com nêutrons. *Departamento de virologia*, pp. 1-4.

Wolf, Mike C., Freiberg, Alexander N., Zhang Tinghu, Akyol-Ataman, Zeynep, Grock, Andrew, Hong, Patrick W., Li, Jianrong, Watson, Nataly F., Fang, Angela Q., Aguilar, Hector C., Porotto, Matteo, Honko, Anna N., Daoiseaux, Robert, Millher, John P., Woodson, Sara E., Chantasirivisal, Steven, Fontanes, Vanessa, Negrete, Oscar A., Krogstad, Paul, Dasgupta, Asim, Moscona, Anne, Hensley, Lisa E., Whelan, Sean P., Faun, Kym F., Holbrook, Michael R., Jung, Michael E. e Lee, Benhur. (2009). A Broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Mount Sinai School of Medicine*, pp. 1-6.

Livros:

Arosa, Fernando A., Cardoso, Elsa M., Pacheco, Francisco C. (2012). *Fundamentos de Imunologia*. 2ª Edição, Lisboa, Lidel.

Blair, E., Darby, G. Gough, G., Littler, E., Rowlands, D. e Tisdale, M. (1998). *Antiviral Therapy*. 1ª edição. Oxford, United Kingdom, Bios Scientific Publishers.

Cann, Alan J. (2005). *Principles of Molecular Virology*. 4ª Edição. UK, Elsevier.

Carter, John R. e Saunders, Vanetia A. (2007). *Virology – Principles and Applications*. UK, Wiley.

Ferreira, W. e Sousa, J. (1998). *Microbiologia, Volume 1*. 1ª edição. Lisboa, Lidel.

Flint, S., Enquist, S., Racaniello, V e Shalka, A. (2009). *Principles of Virology*. 3ª edição. USA, ASM Press.

Golan, David E., Fashjan, Armen H., Armstrong, Ehrin J., Armstrong, April W. (2007). *Principles of Pharmacology – The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 3ª Edição. USA. Lippincott Williams & Wilkins

Kazmerski, Wieslaw M., (2011). “*Antiviral drugs- From Basic Discovery Through Clinical Trials*”, EUA, Wiley.

Luria, E. Darnell, E. e Campbell, A. (1978). *General Virology*. 3ª Edição. New York, John Wiley & Sons.

Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., Pfaller, e Michael A. (2009). *Medical Microbiology*, 6ª Edição, USA, Elsevier.

Pellet, P. e Roizman, B. (2007). *The family herpesviridae: a brief introduction*. 5ª Edição. USA, Lippincott Williams & Wilkins.

Wagner, E. e Hewlett, M. (2004). *Basic Virology*. 2ª Edição. USA, Blackwell Publishing.

Outras fontes:

An viral for enveloped viroses Em linha. Disponível em <<http://www.virology.ws/2010/02/18/an-antiviral-for-enveloped-viruses/>> [Consultado em Outubro de 2012].

Biomedicine Update: Are We About to Slay Viruses Forever?. Em linha. Disponível em <<http://www.21stcentech.com/biomedicine-update-slay-viruses-forever/>> [Consultado em Outubro 2012]

Cientista Em linha. Disponível em <http://isaninhacientista-minicientista.blogspot.pt/2012_04_01_archive.html> [Consultado em Setembro 2012].

Evolution of Virus. Em linha. Disponível em <<http://varuncnmicro.blogspot.pt/2012/04/evolution-of-virus-is-it-fitting-right.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

Imunidade e Controlo de doenças Em linha. Disponível em <<http://biologia12eportefolio.blogspot.pt/p/imunidade-e-controlo-de-doencas.html>> [Consultado em Setembro 2012].

Los Virus. Em linha. Disponível em <<http://b-log-ia20.blogspot.pt/2009/05/los-virus.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

New drug could cure nearly any viral infection. Em linha. Disponível em <<http://web.mit.edu/newsoffice/2011/antiviral-0810.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

OMS adia destruição do vírus da varíola Em linha. Disponível em http://www.bbc.co.uk/portuguese/ciencia/020518_variolae.shtml> [Consultado em Setembro de 2012].

Propriedades gerais dos vírus. Em linha. Disponível em <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/virus/virus-19.php>> [Consultado em Outubro 2012].

SARS veterans tackle coronavírus. Em linha. Disponível em <http://www.nature.com/news/sars-veterans-tackle-coronavirus-1.11513> [Consultado em Outubro 2012].

The Influenza Virus. Em linha. Disponível em <<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>> [Consultado em Outubro de 2012].

Vegana animais Em linha. Disponível em <<http://veganaporamoraosanimais.blog.terra.com.br/2011/09/20/febre/>> [Consultado em Setembro 2012].

Vírus descoberto no Reino Unido pode ser transmitido por animais. Em linha. Disponível em <<http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2012/09/virus-descoberto-no-reino-unido-pode-ser-transmitido-por-animais.html>> [Consultado em Outubro 2012]

ANEXOS

Anexo 1

Modo de funcionamento dos antivirais e respectivos alvos (adaptado de Saxena et al., 2009).

Antivirais	Alvo	Modo de Ação	Exemplo
Inibidores de fusão/ absorção	Proteínas da superfície viral ou recetores das células hospedeiras	Inibem a ligação, fusão e entrada de vírus na célula hospedeira, protegendo as células não infectadas de uma infeção	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclosporina • Enfuvirtida (T-20) • Maraviroc
Inibidores de descapsidação	Proteína de Membrana M2	Bloqueia a M2 (proteína membranar que funciona como canal iónico)	<ul style="list-style-type: none"> • Amantadina • Ramantadina
Inibidores de DNA polimerase	DNA polimerase viral	Atuam como substrato da DNA polimerase provocando uma paragem na síntese da cadeia de DNA viral (Terminador de cadeia)	<u>Análogos nucleosídeos</u> <ul style="list-style-type: none"> • Vidarabina • Aciclovir • Ganciclovir <u>Análogos nucleótidos</u> <ul style="list-style-type: none"> • Cidofovir <u>Análogos não nucleosídeos</u> <ul style="list-style-type: none"> • Foscarnet
Inibidores da transcriptase reversa	Transcriptase Reversa	Inibe a ação da transcriptase reversa ligando-se diretamente à enzima ou bloqueando a cadeia de DNA em crescimento	<u>NRTI:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Zidovudina • Didanosiva • Zalcitabina • Lamivudina <u>ntRTI:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Tenofovir • Adefovir <u>NNRTI:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Efavirenz • Nevirapina • Delavirdina • Etravirina
Inibidores da integrase	Integrase	Bloqueia a ação da integrase, evitando que o DNA viral seja inserido no DNA do hospedeiro	<ul style="list-style-type: none"> • Raltegravir
Inibidores da protéase	Protéase	Inibem a clivagem das novas proteínas dos vírus necessários para a montagem e formação de novos vírus.	<ul style="list-style-type: none"> • Saquinavir • Indinavir • Amprenavir • Nefinavir • Ritonavir
Inibidores da transmissão do vírus	Percursos da transmissão	Redução do GTP; Inibição da iniciação e alongamento do RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Ribavirina
Inibidores da neuramidase	Neuraminidase	Bloqueia a saída do novo vírus por inibição da proteína neuramidase	<ul style="list-style-type: none"> • Zanamivir • Oseltamivir (Tamiflu)

Anexo 2

Descoberta de antivirais nas últimas três décadas (adaptado de Saxena et al., 2009)



2007	Raltegravir
2005	Maraviroc
2004	Telvivudine, darunavir
2002	Etravirine
2000	Entecavir, atazanavir
1999	Valganciclovir, resveratrol, emtricitabine
1998	Palivizumab, tipranavir
1997	Abacavir, adefovir, tenofovir, oseltamivir
1996	Enfuvirtide
1995	Amprenavir, efavirenz, nelfinavir, ritonavir
1994	Indinavir, docosanol, cyclosporine
1993	Zanamivir, valaciclovir, delavirdine
1992	Saquinavir
1991	Lamivudine
1990	Nevirapine
1989	Famciclovir
1988	Cidofovir
1987	Penciclovir, didanosine, stavudine, zalcitabine
1986	Zidovudine
1982	Ganciclovir
1979	Aciclovir, foscarnet
1975	Trifluridine, ribavirin
1973	Phosphonoacetic acid
1969	Rimantadine
1965	Amantadine
1964	Vidarabine
1962	Idoxuridine