

Rui Jorge Pinto Almeida Moreira

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?



Universidade Fernando Pessoa,

Faculdade de Ciências da Saúde,

Porto 2012/13

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Rui Jorge Pinto Almeida Moreira

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?



Universidade Fernando Pessoa,

Faculdade de Ciências da Saúde,

Porto 2012/13

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Rui Jorge Pinto Almeida Moreira

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

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Sumário

A Virologia é uma área em expansão, através desta conseguiu-se caracterizar os vírus conhecidos atualmente. Estes possuem características comuns entre eles, tais como ácido nucleico ou uma cápside e outras que são característica apenas de alguns, por exemplo, invólucro. Os vírus são ainda parasitas intracelulares obrigatórios e necessitam da maquinaria do hospedeiro para se replicarem e provocar uma infecção.

No âmbito das inúmeras doenças provocadas por vírus a ciência tem-se dedicado á investigação de formas de combater estes parasitas capazes de provocar grandes danos nas populações. Das moléculas abordadas, algumas já existiam e apenas se descobriu a sua ação antiviral ate então desconhecida, por outro lado novas moléculas têm sido exploradas com resultados terapêuticos animadores, contudo é ainda necessário mais tempo e mais investigação.

A procura de novas formas/moléculas para combater os vírus exige tempo, dedicação e tem custos elevados, para isso são necessários meios, paciência e apoios. Apesar de tudo têm surgido resultados prometedores nesta área de investigação o que representa esperança num futuro melhor.

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Abstract

The Virology is a growing area, through this we were able to characterize the currently known viroses. These have common characteristics between them, such as nucleic acid or capsid and others that are characteristic of only some, for example, housing. Viroses are obligate intracellular parasites and still require the machinery of the host to replicate and cause an infection.

Within the numerous diseases caused by viruses science has been dedicated to research ways to combat these parasites capable of causing extensive damage in populations. Addressed some of the molecules existed and only discovered its antiviral action until then unknown, on the other hand new molecules have been explored with promising therapeutic results, yet it is still needed more time and research.

The search for new forms/molecules to combat the virus requires time, dedication and has high cost, to that it is necessary means, patience and support. After all there have been promising results in this area of research which represents hope for a better future.

Agradecimentos

Ao professor orientador na realização deste trabalho, o Professor Ricardo Magalhães, por toda a atenção, dedicação e disponibilidade mostrada ao longo da realização do mesmo.

Aos meus pais e irmão pelo apoio prestado ao longo desta jornada, que apesar de minha também se tornou deles pela forma como encararam esta etapa da minha vida.

Á Catarina, á Sara e Filipa, pessoas que de diferentes formas estiveram sempre presentes ao longo dos anos, com grande companheirismo, solidariedade, compreensão e amizade.

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Índice

Capítulo I - Introdução	1
Capítulo II - Vírus	4
1.1 - Constituição dos Vírus	4
1.2 - Ciclo Viral	8
Capítulo III - Antivirais	11
1.1 - Dados Históricos.....	11
1.2- Características	12
Capítulo IV - Novas Moléculas Antivirais	13
1.1 - Niclosamida	13
1.2- DRACO	16
1.3 - Melitina	19
1.4- Boceprevir e Telaprevir	21

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

1.5- RNA Interferência.....	23
Capitulo V - Conclusão	27
Bibliografia.....	28

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Índice de abreviaturas

BOC - Boceprevir

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DRACO – Double RNA Activated Caspase Oligomerizer

HCV – Vírus da Hepatite C

HPV – Vírus do Papiloma Humano

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi – Ácido Ribonucleico de interferência

SARS – Síndrome Respiratório Agudo Grave

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TLV - Telaprevir

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Índice de figuras

Figura 1: Classificação Baltimore (Anon n.d.).....	6
Figura 2: Estrutura dos vírus (Anon n.d.).....	7
Figura 3 Ciclo infeccioso (Peterlin & Trono 2003)	9
Figura 4: Estrutura química da Niclosamida (Sack et al. 2011).....	14
Figura 5: Mecanismo de ação da DRACO (Anon n.d.).....	18
Figura 6: Mecanismo de ação da Melitina (Hood et al. 2013)	21

Capítulo I - Introdução

Os vírus existem desde os primórdios do Planeta Terra, desde o aparecimento dos primeiros seres vivos que a sua existência se tornou possível e assim se iam multiplicando e passando de ser vivo para ser vivo perpetuando a sua existência e proliferação até aos dias de hoje.

Antes da segunda Guerra Mundial foram introduzidas algumas vacinas que preveniam infeções por determinados vírus, por exemplo, vacina contra a Varíola, Raiva, Tuberculose, Tosse Convulsa, entre outros. Mais tarde, já depois da segunda grande Guerra foram introduzidas outras igualmente importantes, tais como, vacina contra Rubéola, Sarampo, Hepatite B, entre outras. A vacinação contra os agentes responsáveis pelas infeções anteriormente referidas trouxe uma redução drástica no número de infetados e conseqüentemente no número de mortes daí advindas. Conseguiu-se redução de taxas de morte precoce, aumento da longevidade, conseqüentemente aumento da esperança média de vida. Para além disso, conseguiu-se um aumento na qualidade de vida das populações. Estava encontrada uma forma para combater agentes que provocavam morte e devastação nas populações, os vírus. Deste modo a ciência procura solucionar questões ainda não resolvidas por forma a reduzir o número de infeções virais, bem como tratar as ocorrências da forma mais eficaz possível, assim surge um interesse acrescido pelo presente trabalho.

Diferentes antivirais têm sido usados ao longo dos anos por forma a combater as inúmeras infeções causadas por diversos vírus, tais como Herpes vírus, Influenza vírus, VIH entre outros. Atualmente há vários antivirais, apesar de alguns serem de largo espetro, como a Ribavirina, apresentam especificidade baixa o que não garante uma boa

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

eficácia no tratamento e pode gerar resistências (Debing et al. 2013). Deste modo demonstra-se a necessidade de descobrir novas substâncias antivirais.

As novas moléculas antivirais são o ponto fulcral deste trabalho, explorando o futuro das mesmas, tanto do ponto de vista das já existentes mas também averiguando qual o caminho a seguir no desenvolvimento de novas moléculas.

O tratamento de infeções viricas tem um peso relevante no orçamento das sociedades, por exemplo, o uso de novas moléculas para o tratamento da SIDA acarreta custos elevados a curto prazo (Rizzardini et al. 2012). A infeção virica traz ao infetado desconforto, mau estar físico e mental e por vezes perigo de vida mediante o tipo de infeção, isto porque as infeções viricas podem estar associadas a outro tipo de males no hospedeiro, tal como o cancro, exemplo disso mesmo é o HPV. Para além deste último pode-se associar os vírus a outros tipos de cancros, não descurando que os cancros não são causados exclusivamente por vírus mas sim por uma série de fatores entre os quais se enquadram os vírus (Pagano et al. 2004).

Atualmente há milhões de pessoas infetadas por vírus, exemplo disso mesmo é a Hepatite B que regista cerca de 400 milhões de pessoas infetadas por todo o globo (Odaibo et al. 2012). Verifica-se também o aumento de determinadas infeções virais, por exemplo, a SIDA ou Hepatite C, como revela um estudo efetuado na Carolina do Norte (Kolman et al. n.d.), sendo que os valores apresentados no estudo não ocorrem de forma igual em todo o mundo. Deste modo podemos aferir que há um aumento generalizado por todo o planeta do número de infetados por vírus, podendo-se excluir deste lote todos aqueles para os quais já há vacinação o que leva a uma tendencial redução do número de infetados.

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Mediante o supra mencionado o presente trabalho ganha outro relevo, dado que novas moléculas antivirais podem trazer melhor qualidade de vida aos infetados, curar algumas infeções até então não curáveis, prevenir a disseminação virica, reduzir custos com o tratamento, eventualmente aumentar a esperança média de vida em grupos de risco e potenciar uma melhoria dos tratamentos.

Antes de se explorar as formas de tratamento e eliminação/controlo de um dado agente virico é crucial conhecer bem o mesmo, o seu ciclo de vida, o ciclo infeccioso e de replicação, mas também avaliar o hospedeiro, as características que este tem que permitem ao agente infeccioso instalar-se e proliferar. Após esta primeira fase estão reunidas as condições básicas para se procurar novas moléculas antivirais que sejam cada vez mais rápidas a atuar, com menos efeitos secundários para o hospedeiro, mais eficazes e eficientes mas também com um espectro de ação cada vez mais alargado.

O presente trabalho visa então uma revisão bibliográfica onde serão abordados os pontos anteriormente referidos, tendo em conta que inerente a cada um deles existem aspetos mais ou menos importantes e o aprofundamento é feito de acordo com este mesmo aspeto. Assim, são utilizados livros e artigos que revelam importância no âmbito do trabalho.

Capítulo II - Vírus

A definição de vírus não foi sempre a mesma, foi modificada ao longo dos tempos por forma a adequar-se aos novos conhecimentos sobre estes agentes até à definição que se conhece na atualidade. Inicialmente os vírus eram conhecidos como agentes patogénicos, de pequeno tamanho e dependentes de um organismo hospedeiro para se reproduzirem, hoje em dia é possível ir mais além.

A elaboração do relacionamento entre vírus e a célula hospedeira permite atingir um conhecimento mais profundo e uma definição de vírus mais adequada que anteriormente. Deste modo pode, para lá do descrito anteriormente, acrescentar-se mais algumas características destes agentes por forma a obter uma descrição mais completa dos mesmos. Os vírus são agentes infecciosos, são parasitas intracelulares, no seu genoma tem apenas um ácido nucleico, RNA ou DNA. Dentro de uma célula hospedeira apropriada, o genoma viral dirige a síntese celular para efetuar inúmeras cópias de todos os componentes virais. Virião é o nome dado à partícula infecciosa formada pela automontagem dos compostos recém sintetizados na célula hospedeira, assim o virião é um descendente do vírus. Este virião formado durante o ciclo infeccioso torna-se o veículo para a transmissão do genoma viral para a próxima célula onde ocorrerá novo ciclo infeccioso (Jane S. Flint et al. 2009).

1.1 – Constituição dos Vírus

Os vírus não são todos iguais, apresentam diferentes características e por isso são agrupados de formas diferentes, tais como família, subfamília, género e espécie. De

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

forma geral, os vírus são compostos por um ácido nucleico, DNA ou RNA e cápside, podendo ainda alguns vírus ter uma outra camada mais externa designada involucro.

No que concerne ao genoma viral este pode ser DNA ou RNA, cadeia dupla ou apenas uma única cadeia. O DNA pode ter as suas extremidades ligadas de forma covalente o que origina um genoma circular, ou ter as extremidades livres e ser um genoma linear, podendo ser também cadeia dupla, ter as extremidades ligadas e ser linear na mesma. Quanto ao RNA apresenta-se de forma linear, geralmente os vírus com este ácido nucleico apresentam-no sob a forma de uma cadeia apenas. O RNA pode ser ainda classificado como RNA positivo (RNA+) quando o RNA genómico serve também como RNA mensageiro (RNAm) e é traduzido pelos ribossomas da célula hospedeira. Por outro lado pode também ser classificado como RNA negativo (RNA-) quando o RNA genómico é complementar ao RNA que é traduzido e por isso não pode ser traduzido diretamente pelos ribossomas da célula hospedeira. Existem mais alguns tipos, como o vírus da hepatite B que é um vírus de cadeia dupla, simples e uma "cauda" de RNA. Dado que os vírus apresentam diferentes mecanismos de transcrição foi criada a classificação de Baltimore (sete grupos), que agrupa os vírus mediante o seu modo de transcrição (Jane S. Flint et al. 2009):

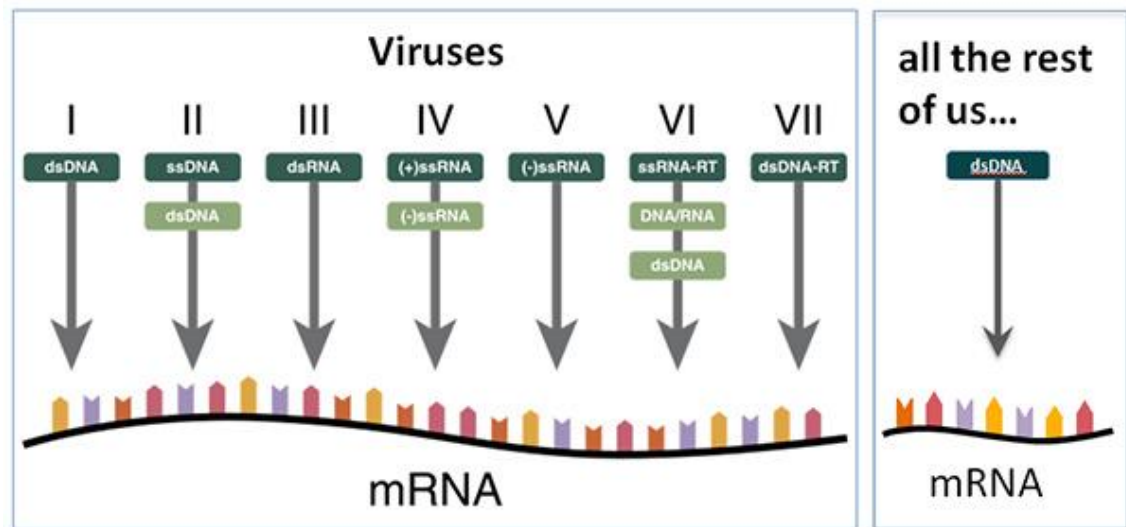


Figura 1: Classificação Baltimore (Anon n.d.)

Grupo I - Vírus DNA de cadeia dupla (dsDNA)

Grupo II - Vírus DNA de cadeia simples (ssDNA)

Grupo III - Vírus RNA de cadeia dupla (dsRNA)

Grupo IV - Vírus RNA de cadeia simples positivo ((+)ssRNA)

Grupo V - Vírus RNA de cadeia simples negativo ((-)ssRNA)

Grupo VI - Vírus RNA com transcrição reversa (ssRNA-RT)

Grupo VII - Vírus DNA com transcrição reversa (ssDNA-RT)

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

A cápside é formada por uma associação proteica, várias cópias de uma mesma proteína ou junção de diferentes proteínas, tem como função proteger o genoma viral de agressões físico-químicas e a sua transferência entre células e hospedeiros (Mateu 2012). É característica de cada família viral uma forma geométrica da cápside que pode ser diferente da de outras famílias. Pode-se encontrar cinco formas estruturais básicas de partículas virais: Icosaédrico sem involucro (ex.: adenovírus), Helicoidal sem involucro (ex.: vírus do mosaico do tabaco). Icosaédrico com involucro (ex.: togavirus e flavivírus), Helicoidal com involucro (ex.: rabdovírus) ou ainda os Complexos (ex.: bacteriófagos e poxvirus) (Jane S. Flint et al. 2009).

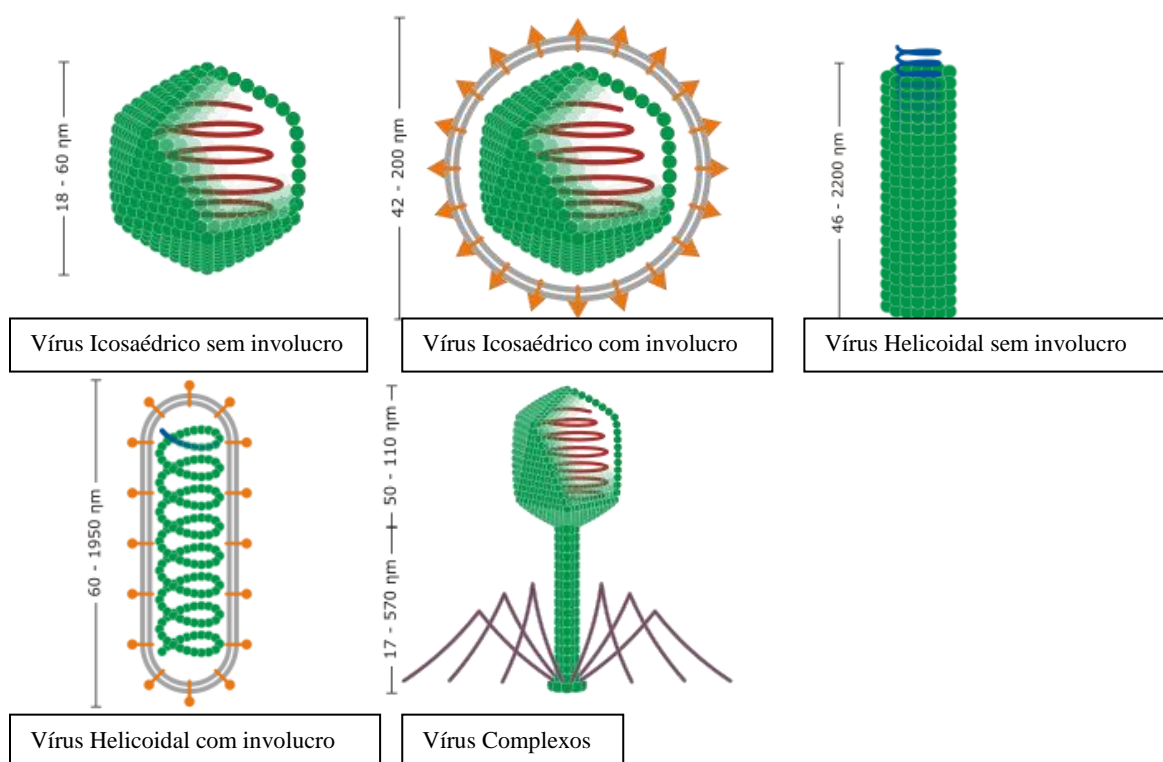


Figura 2: Estrutura dos vírus (Anon n.d.)

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

O involucro, apenas presente em algumas famílias de vírus, é composto por uma camada dupla de lípidos associados a proteínas, estas desempenham diferentes funções, ancoragem inicial á célula, penetração, fusão e disseminação do vírus entre as células. Alguns fármacos antivirais atuam sobre as glicoproteínas do involucro dificultando a ancoragem á célula, atrasando assim a infecção viral (Arenzana-Seisdedos 2008).

O genoma dos vírus codifica proteínas estruturais e não estruturais. As primeiras dizem respeito ás proteínas que fazem parte da estrutura física da partícula viral, cápside e involucro. Por outro lado as não estruturais são sintetizadas no interior da célula hospedeira e desempenham diferentes funções na replicação viral. Em alguns vírus com involucro há uma camada proteica designada de tegumento entre a cápside e o involucro, as proteínas que o compõe são também estruturais. A transcriptase reversa dos retrovírus, que produz cópias de DNA a partir de RNA para serem incorporados na célula hospedeira, é um exemplo de proteína não estrutural, apresentando-se como um alvo de fármacos antivirais (Imaz & Podzamczar 2012). Há vírus que codificam várias proteínas não estruturais com funções acessórias na regulação da expressão dos genes quer celular quer viral, nomeadamente, regulação do ciclo replicativo do vírus, neutralização de mecanismos de defesa do hospedeiro, entre outros (J. Han et al. 2012).

1.2 - Ciclo Viral

Os vírus não se replicam fora de células, apenas de forma intracelular. Por forma a desenvolver novos fármacos antivirais é necessário entender todo o ciclo viral, desde a sua entrada na célula, a replicação e a libertação do vírus, em suma, todas as etapas do ciclo infeccioso.

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

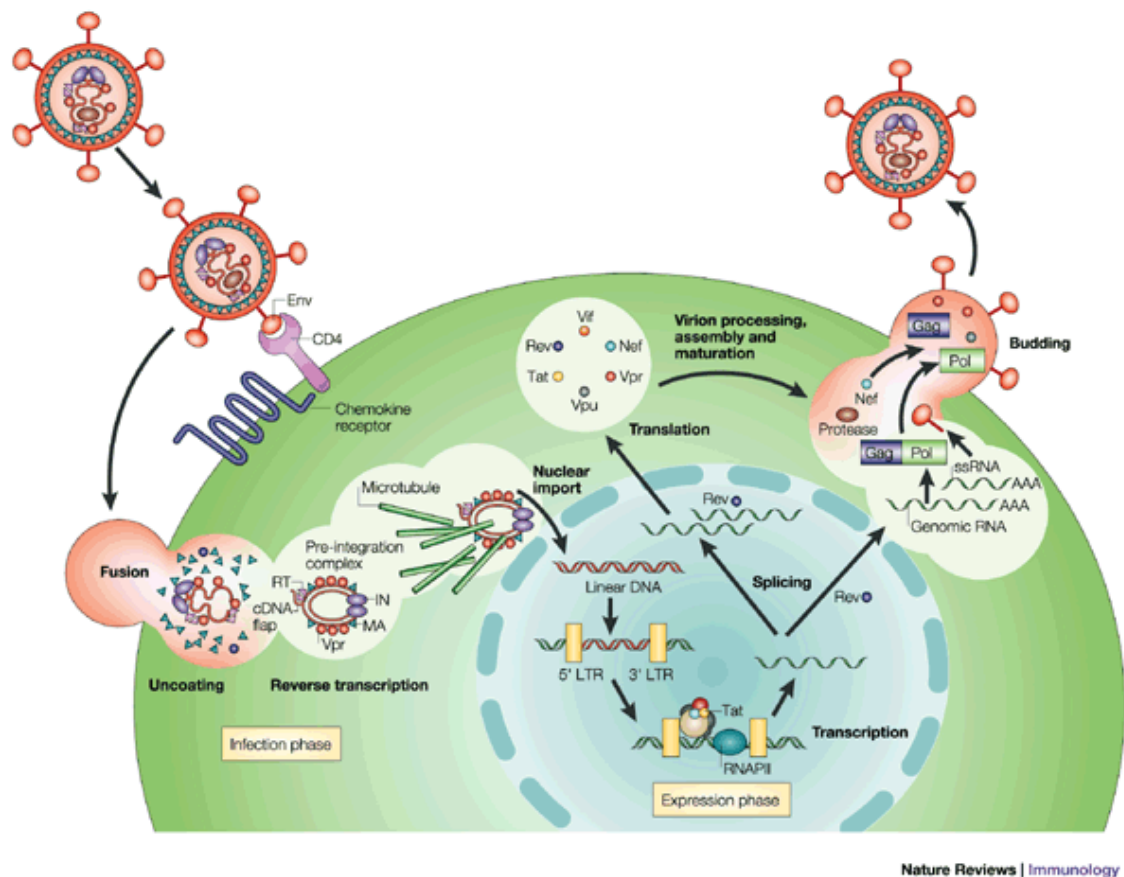


Figura 3 Ciclo infeccioso (Peterlin & Trono 2003)

A adsorção é uma fase que ocorre entre o vírus e a superfície da célula, recetor e ligante unem-se através de proteínas presentes no involucro ou cápside e a célula. Estas ligações podem ocorrer, por exemplo, por pontes de hidrogénio ou forças de Van Der Waals. Muitas das proteínas celulares que intervêm nestas ligações são imunoglobulinas ou transportadores transmembranares. Uma maior quantidade de vírus presente aumenta a probabilidade de haver a interação entre ligante e recetor. A não ocorrência de adsorção garante que não ocorra infeção, por outro lado a ocorrência de adsorção não garante infeção já que esta depende de outros parâmetros para acontecer. Esta é uma

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

potencial etapa do ciclo viral a ser explorada para se investigarem novos fármacos antivirais (Villar & Barroso 2006).

A penetração é o processo de introdução do ácido nucleico do vírus na célula hospedeira, pode ocorrer por endocitose, formando endossomas. Os vírus com involucro podem recorrer a um processo de fusão, onde o involucro se funde com a membrana plasmática, esta pode acontecer de forma direta (fusão a partir do meio extracelular) ou de forma indireta (endocitose inicial com posterior fusão já no interior da célula). Posteriormente ocorre a descapsidação no citosol ou no núcleo celular, este é o processo através do qual o material genético do vírus é libertado e exposto no meio intracelular por forma a ser posteriormente transcrito, traduzido e replicado (Jane S. Flint et al. 2009).

Após a libertação do material genético no interior da célula inicia-se a síntese proteica. Independentemente do material genético, DNA ou RNA, cadeia dupla ou simples o genoma deve ser capaz de originar RNA mensageiro que seja reconhecido e traduzido pela célula.

Após a replicação viral ocorre a montagem das partículas virais. Nos vírus que não têm involucro acontece uma associação entre o genoma e as proteínas que formam a nucleocápside, é um processo espontâneo que ocorre devido às interações entre as proteínas e entre estas e o genoma. Noutro tipo de vírus a nucleocápside adquire uma camada mais externa, o involucro, que deriva de membranas celulares (nuclear, reticulo endoplasmático, complexo de Golgi ou membrana plasmática), com uma camada dupla de lípidos de origem celular e também proteínas virais (Wild et al. 2002). O involucro é adquirido por um processo de rompimento que não implica necessariamente a morte

celular, que leva á libertação das novas partículas virais. Por outro lado os vírus não contendo involucro são libertados através da lise celular (Shaikh & Crowe 2013).

Capítulo III – Antivirais

1.1 – Dados Históricos

Os vírus representam uma classe de microrganismos que sempre causaram incómodo ao Homem, com diferentes consequências para este ultimo, desde situações como uma simples gripe até situações mais extremas provocando a morte ao ser humano.

Atualmente a única doença erradicada do globo é a varíola, esta devastou inúmeros povos por todo o planeta. A vacina contra a varíola apareceu na década de 1970. A vacinação permitiu reduzir drasticamente o número de infeções referentes a várias doenças até então causadoras de milhares de mortes, como sarampo, poliomielite, febre amarela ou raiva.

Ao longo dos anos muitas outras descobertas foram feitas, como o uso de Amantadina nos anos 60 para tratamento de infeções pelo vírus influenza A, ou a Ribavirina sintetizada pela primeira vez em 1970 e usada, por exemplo, no tratamento da hepatite C. As descobertas não se limitaram ao tratamento de infeções viricas mas também bacterianas, também neste campo foram descobertas novas moléculas para o tratamento de determinadas infeções (Enquist 2009).

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Deste modo os investigadores e a indústria procuraram sempre a descoberta de novas moléculas que permitissem erradicar ou pelo menos reduzir para valores muito baixos o número de infeções viricas, tendo sempre em conta a melhoria de determinadas características, tais como a biodisponibilidade do fármaco, a sua solubilidade, a menor toxicidade possível, um tempo de semivida adequado, bem como outras características inerentes á própria forma farmacêutica (Enquist 2009).

1.2 – Características

Há vários tipos de fármacos antivirais, cada qual apresenta um mecanismo de ação único, mas todos eles apresentam fins comuns, impedir a infeção, a evolução ou o tratamento da infeção virica. Como tal o antivírico a ser usado deveria, idealmente, apresentar determinadas propriedades:

- Largo espectro de ação;
- Eficácia acentuada na inibição da replicação virica;
- Baixa toxicidade para o hospedeiro;
- Não interferir com o sistema imunitário do hospedeiro;
- Boa biodisponibilidade;
- Não permitir o desenvolvimento de resistências.

Apesar de inúmeros antivirais disponíveis no mercado estes ainda não preenchem as características do antivírico ideal, uma das razões prende-se com a falta de um espectro de ação alargado, perante este facto os fármacos antivirais são agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação. Dentro dos antivíricos mais recentes pode-se encontrar alguns fármacos importantes usados na última década, tais como o valganciclovir, ativo contra citomegalovirus (Kotton 2013), a emtricitabina

usada em terapia de associação de primeira linha para o tratamento de VIH-1 (Plosker 2013), bem como o atazanavir, também utilizado no tratamento de infeção por VIH (Dumond et al. 2013). Um outro fármaco antiviral usado nos últimos anos é o tipranavir, é um inibidor de proteases não peptídico, ativo contra alguns vírus resistentes a outros inibidores de proteases (M. Aoki et al. 2012). Estes fármacos bem como outros têm sido importantes mas não suficientes no tratamento de determinadas infeções virais.

Capítulo IV – Novas Moléculas Antivirais

1.1 – Niclosamida

A Niclosamida foi introduzida no mercado no início da década de sessenta, utilizada como anti-helmíntico, antineoplásico e mais recentemente como antiviral, é um ácido lipofílico fraco que inibe infeções provocadas por determinados tipos de vírus, como influenza vírus ou rinovírus, é um inibidor de ampla gama contra vírus dependentes de pH, estes vírus fundem-se com a membrana do endossoma dado que a proteína G necessita do pH ácido desse mesmo endossoma para facilitar o processo de fusão.

Para se avaliar a eficácia da niclosamida esta foi usada em diferentes tipos de rinovírus e influenza vírus, verificou-se que as estirpes dependentes de pH eram mais sensíveis á niclosamida do que as não dependentes de pH (Jurgeit et al. 2012).

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Para testar se de fato a atividade antiviral estava relacionada com a alteração de pH efetuou-se um comparação entre um grupo controlo e 16 substancias relacionadas com a niclosamida mudando apenas um grupo funcional. Verificou-se que 4 dos 16 compostos tinham resultados idênticos á niclosamida, levando a crer que o grupo hidroxilo em R1 ou a amida central são os grupos relacionados com a sensibilidade ao pH (Jurgeit et al. 2012).

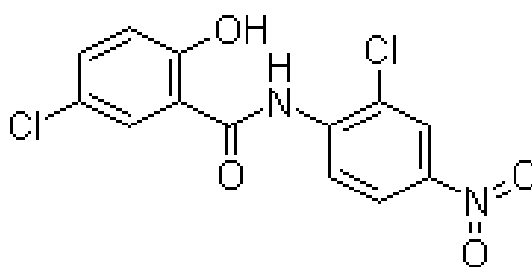


Figura 4: Estrutura química da Niclosamida (Sack et al. 2011)

Ficou demonstrado que a ação antiviral da niclosamida é mais acentuada antes da libertação do material genómico do vírus, pensando-se que possivelmente a niclosamida impedia a entrada do mesmo na célula. Esta substância obteve resultados semelhantes a outros antivirais como o pleconaril, que inibe a entrada do vírus na célula ligando-se á cápside viral.

Verificou-se que o uso de niclosamida apenas se revela eficaz se usado nos primeiros 30 minutos após a entrada do vírus no organismo, já após 120 minutos a niclosamida não se revelou eficaz. A mesma conclusão se tira de outras substâncias semelhantes a niclosamida, variando apenas em grupos funcionais, verificam-se eficazes nos primeiros 30 minutos após entrada do vírus no organismo e 120 minutos depois já não apresentam qualquer eficácia (Jurgeit et al. 2012).

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Percebeu-se então que a niclosamida altera a distribuição dos endossomas devido á neutralização do pH, dado que estes possuem um pH baixo e a niclosamida provoca um aumento de pH pelo fato de ser um transportador de protões para o exterior do endossoma (Jurgeit et al. 2012). Deste modo a niclosamida impede a disseminação do material genómico viral no interior da célula hospedeira, assim se justifica também a eficácia ou ineficácia desta molécula nos primeiros 30 minutos ou 120 minutos, respetivamente, após a entrada do vírus no organismo.

Em Novembro de 2002 no sul da China foi identificado pela primeira vez o SARS, mais tarde, em 2003 ocorreu em Hong Kong um surto grave desta nova doença, a mesma tem revelado uma considerável morbidade e mortalidade entre os humanos, estando associada a um coronavírus, SARS-CoV (Lee et al. 2003).

Avaliou-se a eficácia da niclosamida na inibição da replicação do SARS-CoV, usando células Vero. Estas foram infetadas com E6 SARS-CoV, com uma multiplicidade de infeção de 0.1. As células Vero E6 quando infetadas a esta multiplicidade começaram a apresentar um suave efeito citopático dois dias após a infeção. O uso de niclosamida 1h antes da infeção impediu o efeito citopático, dado que impediu a replicação do SARS-CoV. Uma análise de imunomarcção mostra que a niclosamida, a uma concentração de 1,56 mM ou mais elevada, inibiu totalmente a síntese de antigénios virais de SARS-CoV em células Vero E6 (C.-J. Wu et al. 2004).

Para avaliar se a síntese de vírus teria sido também inibida pela niclosamida foi ainda analisado o sobrenadante das diferentes culturas, usando a transcriptase reversa para a deteção de RNA viral. Constatou-se que a niclosamida inibiu a síntese de novos vírus para concentrações iguais ou superiores a 3,12mM. Verificou-se ainda que a

adição de niclosamida 3h após infecção não impedia a interação entre o vírus e a célula (C.-J. Wu et al. 2004).

Tal como antigamente a niclosamida é usada como anti-helmíntico e pesticida, porém, estuda-se atualmente o seu potencial no tratamento de certas doenças, por exemplo o cancro (H. Chen et al. 2013), (J.-X. Pan et al. 2012), bem como o tratamento de infeções bacterianas por *Pseudomonas aeruginosa* (Imperi et al. 2013).

1.2 - DRACO

Hoje em dia, a variedade de antivirais não é muita face ao desejado e os que existem são específicos para determinados vírus ou então apresentam algumas desvantagens, tais como custo de produção, dificuldade de manipulação ou ainda efeitos secundários sobre o hospedeiro.

Um antiviral com características próximas do ideal seria aquele que junta-se poucos ou nenhuns efeitos secundários para o hospedeiro e que por outro lado tivesse um amplo espectro de ação, abrangendo um grande número de vírus. DRACO pode representar o início de uma nova fase na história dos antivirais dado que apresenta características que o colocam na rota do antiviral ideal. Esta nova molécula apresenta eficácia contra quinze tipos de vírus diferentes, incluindo o da vírus da Dengue, Amapari, Arenavírus Tacaribe e H1N1, não sendo tóxico em onze tipos de células de mamíferos (Rider et al. 2011). DRACO é já considerada por muitos como a maior descoberta desde a penicilina.

Quando os vírus infetam uma célula, eles assumem a sua maquinaria celular para criar mais cópias do vírus, durante este processo os vírus criam longas cadeias de RNA

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

de cadeia dupla (dsRNA), estas não são encontradas em células animais humanas ou de outros mamíferos.

Esta nova abordagem no estudo da DRACO utiliza dois mecanismos celulares naturais. O primeiro processo é relativo á deteção de dupla cadeia de RNA por via do interferão, as células dos mamíferos não produzem cadeias longas duplas de RNA, ou seja, com mais de 22 ou 23 pares de bases, as defesas celulares exploram este facto para tentarem eliminar vírus presentes na célula através da identificação destas longas cadeias características de determinados vírus (Rider et al. 2011).

Por outro lado há um segundo processo que completa o mecanismo de ação da DRACO, este relaciona-se com uma das últimas fases do processo de apoptose onde as caspases (enzimas que clivam proteínas, mecanismo de morte celular programado (Hensley et al. 2013)) são ativadas com a finalidade de provocar apoptose. Há vírus que conseguem impedir a apoptose, por exemplo inibindo o p53 (supressor de tumor (Kofman et al. 2013)), por outro lado alguns inibem diretamente a ação das caspases, por exemplo o vírus da peste suína africano (que diminui a atividade da caspase 3 pelo menos durante as primeiras horas de infeção (Portugal et al. 2009)), este é um dos factos pelos quais o organismo não consegue provocar a morte da célula antes do término do ciclo de multiplicação viral.

Assim, DRACO não é mais do que uma proteína com uma zona que se liga ao dsRNA viral e uma segunda zona (por exemplo, zona de ligação a uma procaspase) que induz a apoptose. Se não estiver presente na célula dsRNA viral a DRACO não forma ligações cruzadas e não ocorrerá morte celular. Deste modo quando uma das extremidades do DRACO se liga ao dsRNA, ele sinaliza a outra extremidade do DRACO para iniciar o mecanismo de apoptose.

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

Dado que a DRACO provoca a morte imediata de qualquer célula infectada que contenha o dsRNA viral, torna-se mais difícil para o vírus ganhar resistência a esta nova droga.

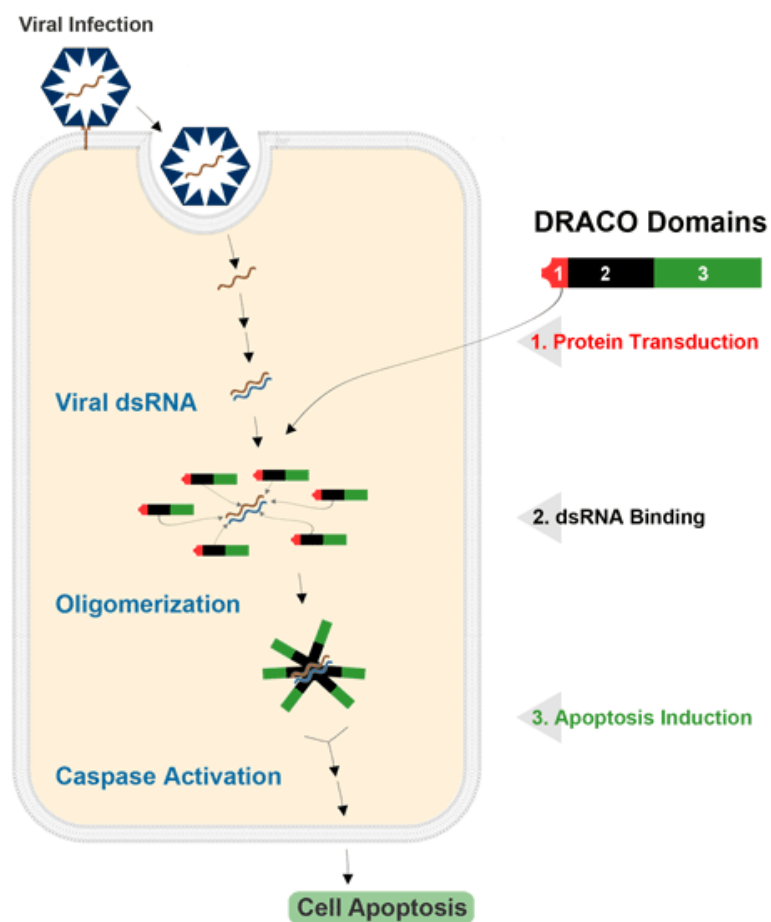


Figura 5: Mecanismo de ação da DRACO (Anon n.d.)

1.3 – Melitina

A melitina é uma substância presente no veneno das abelhas, tem sido usada pela indústria para a produção de cremes com efeito antirrugas, a melitina transmite a sensação da picada de uma abelha, levando a uma reação inflamatória ao veneno, de tal modo que aumenta o fluxo sanguíneo, estimula a produção de colagénio (fortalece os tecidos corporais) e de elastina (aumenta a flexibilidade dos tecidos), reduzindo as rugas.

Por outro lado esta toxina tem outras potencialidades, nomeadamente no campo da Virologia. Investigadores da Universidade de Washington identificaram eficácia desta toxina sobre diferentes vírus, entre os quais o VIH. A melitina forma pequenos complexos porosos e atua sobre o invólucro do vírus criando buracos neste, mas não afeta as células normais isto porque a melitina é veiculada em nano partículas que têm um composto que funciona como barreira (“para-choques”) deixando passar apenas substância de menor tamanho, por exemplo o vírus VIH, porém não permite a passagem de células dado que estas apresentam um tamanho superior á nano partícula, assim apenas as substâncias com tamanho inferior á nano partícula entraram em contacto com a mesma e consequentemente com a toxina (Hood et al. 2013).

O estudo feito pelos investigadores Americanos visa o desenvolvimento de um gel vaginal que bloqueie a infeção viral (Hood et al. 2013). O estudo foi feito usando nano partículas carregadas com melitina por forma a avaliar a sua toxicidade sobre as células bem como avaliar a capacidade de inibir o CXCR4 e CCR5 do VIH-1. Após os testes sobre células vaginais e sobre o CXCR4 e CCR5 do VIH-1 verificou-se que a melitina livre é citotóxica mas quando veiculada nas nano partículas não apresenta qualquer citotoxicidade. Por outro lado verificou-se também eficácia das nano partículas

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

na inibição do CXCR4 e CCR5 do VIH-1 (CMI 50% - 3,7ug/ml e 0,03ug/ml respetivamente) (Hood et al. 2013). Deste modo demonstra-se que a melitina apresenta diferentes modos de atuação, por um lado atua sobre o invólucro do vírus provocando a destruição do mesmo por lado atua também inibindo o CXCR4 e CCR5 do VIH-1.

Para além do supra referido um estudo recente sobre uma melitina mutante (melitina mutante humano interleucina 2, melitina MhIL-2) tem apresentado resultados animadores no tratamento do cancro no ovário ao inibir o crescimento do mesmo (Mingjun Liu et al. 2013), apesar de ainda estar em fase inicial promete ser muito útil num futuro próximo. Está também em fase inicial de estudo a ação da melitina combinada com *E. coli* para o tratamento do cancro, apresentando já os primeiros resultados com eficácia no tratamento de leucemia, provocando a destruição das células anormais e afetando em baixa percentagem os eritrócitos saudáveis (Hongyan Liu et al. 2013).

As nano partículas com melitina apresentam um elevado potencial no que concerne ao tratamento ou prevenção de infeções provocadas por vírus com involucro, é por isso uma área de elevado interesse dadas as inúmeras infeções provocadas por estes tipos de vírus no seres vivos, nomeadamente no Homem.

Anteriores abordagens terapêuticas visavam a inibição da replicação viral, esta nova abordagem (melitina) permite o que outros fármacos não permitiam, impedir ou diminuir a probabilidade de ocorrer uma infeção inicial.

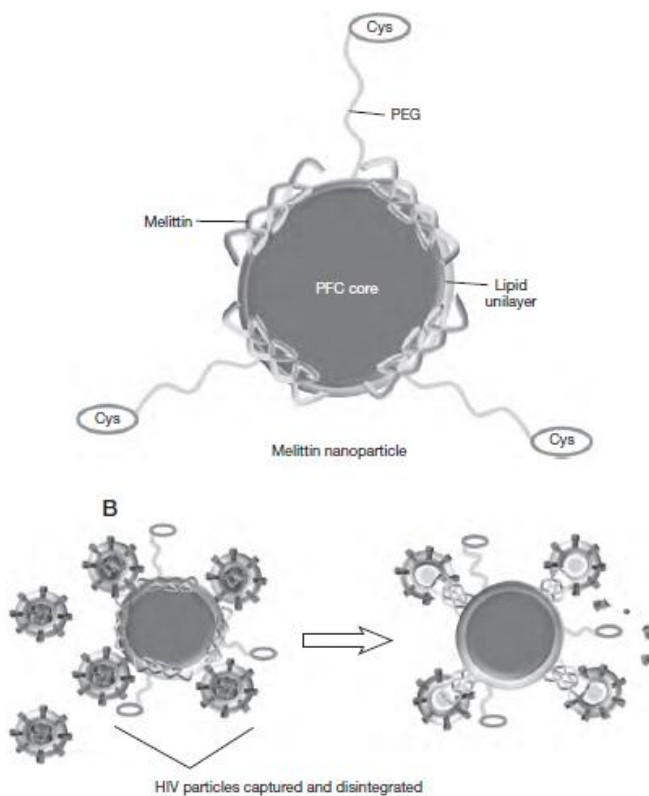


Figura 6: Mecanismo de ação da Melitina (Hood et al. 2013)

1.4 - Boceprevir e Telaprevir

O vírus da hepatite C é um dos agentes com maior importância no que respeita a doenças crónicas no fígado, sendo responsável por cerca de 40% dos casos de cirrose, 70% das hepatites crónicas e 60% dos cancros hepáticos (Alter 2007).

Existem seis tipos (genótipos) de HCV, com inúmeros subtipos, sendo que o subtipo 1a e 1b provocam aproximadamente 60% das infeções mundiais provocadas por

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

HCV (Simmonds 1999). Cerca de 40 a 50% dos pacientes com genótipo 1 apresentam uma resposta virológica sustentada ao tratamento com peginterferão alfa combinado com Ribavirina (Fried et al. 2002), já os portadores dos genótipos 2 e 3 respondem numa percentagem de aproximadamente 80% (ZEUZEM 2004).

A necessidade da busca de novos antivirais para o tratamento do HCV advém da falta de eficácia no tratamento da doença usando Ribavirina e Peginterferão, isto acontece por inúmeros fatores, por exemplo, o desenvolvimento de resistências a estes fármacos ou a heterogeneidade genética viral (Qashqari et al. 2013). A resistência aos inibidores da protéase (Boceprevir e Telaprevir) acontece devido a mutações em pontos-chave da protéase NS3/4A, ou então devido a variantes resistentes á droga que transportam mutações que afetam a ligação dos inibidores da protéase aos respetivos recetores (Shang et al. 2013).

Boceprevir e Telaprevir apresentam-se como as primeiras moléculas inibidoras de protéase para o tratamento de HCV. Estas moléculas ligam-se de forma covalente, mas reversível, à serina do local ativo da protéase NS3 (proteína não estrutural envolvida diretamente na replicação viral dado que permite que a serina seja substituída por alanina (Bartenschlager et al. 1994)) através de um grupo funcional alfa-ceto amida, de forma a inibir a replicação virica nas células hospedeiras infetadas pelo VHC (Q. Pan et al. 2012).

A monoterapia com Telaprevir ou Boceprevir tem sido associada a resistências, por outro lado estas moléculas por si só não são suficientes para a completa erradicação do vírus, como tal, o tratamento combinado com Peginterferão e Ribavirina surgiu como a solução definitiva para resolver essas limitações (Q. Pan et al. 2012). Portadores de HCV genótipo 1 e VIH obtiveram melhores resultados na terapia combinada do que

em monoterapia com Peginterferão e Ribavirina onde a eficácia é baixa (Sulkowski et al. 2013).

A terapia tripla da hepatite C provocada por HCV apesar de se ter vindo a revelar muito eficaz apresenta algumas desvantagens associadas, esta terapêutica apresenta efeitos secundários importantes, nomeadamente, quadros de anemia após transplante hepático (Londoño et al. 2013) ou efeitos dermatológicos severos como rash cutâneo ou síndrome de Stevens-Johnson (necrose ou eritema que pode afetar mucosas, oral, anal, genital e ocular) (Torii et al. 2013). Estes factos remetem a ciência para a continuação da investigação por forma a manter ou melhorar a eficácia terapêutica mas por outro lado encontrar formas de diminuir ou eliminar os efeitos secundários e interações medicamentosas.

A eficácia terapêutica da terapia tripla sobre HCV permite reduzir a frequência de administrações de fármaco bem como o tempo de tratamento. Estudos recentes apontam já para 2015 o próximo passo na terapia antiviral que será a combinação oral de novos antivirais de ação direta para o tratamento de HCV crónico (S Pol et al. 2013).

1.5 – RNA Interferência

A evolução do planeta e do Homem foi sempre acompanhada pelos vírus, tal como nós, estes também foram criando mecanismos para fazer face á evolução dos seres vivos, assim foram-se adaptando a alterações nos sistemas imunitários dos hospedeiros, terapêuticas farmacológicas entre outros (Shah & Schaffer 2011).

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

O RNAi baseia-se num mecanismo onde moléculas de RNA que são complementares ao RNA mensageiro inibem ou dificultam a tradução ou transcrição de genes específicos (Shah & Schaffer 2011).

A interferência da dupla cadeia de RNA na tradução pode ser mediada por dois tipos de moléculas, micro RNA ou siRNA (small interfering RNA). Os micro RNA apresentam uma sequência com cerca de 20 a 22 nucleótidos. Por outro lado, é a partir de longas e duplas cadeias de RNA exógeno, que a enzima DICER efetua cortes gerando o siRNA, sendo este um pequeno fragmento de RNA com cerca de 23 pares de nucleótidos (Shah & Schaffer 2011).

Os fragmentos de siRNA combinam-se com proteínas formando um complexo ribonucleoproteico conhecido como RISC (RNA induced silencing complex). Após a conjugação uma das cadeias de RNA é eliminada sendo a outra uma “ponte” entre a RISC e RNA mensageiro específico, o qual será o alvo da ação do RNAi. Quando a ligação entre a RISC e o RNA mensageiro é completa uma enzima designada Argonauta (subunidade da RISC) destrói o RNA mensageiro. Por outro lado se esta ligação não se dá de forma completa, a Argonauta não atuará de forma a destruir o RNA mensageiro, porém esta ligação não completa permite que haja uma inibição da tradução desse mesmo RNA mensageiro ficando este destabilizado e é posteriormente degradado no citoplasma nos corpos de processamento (Shah & Schaffer 2011).

No que respeita ao micro RNA não ocorre a formação de nenhuma proteína, sendo que quando ocorre a transcrição de um gene forma-se uma cadeia longa de RNA com sequências que se completam na própria cadeia levando a que esta se dobre e se fixe formando grampos sendo estes posteriormente degradados por uma enzima

designada DROSHA, assim formam-se fragmentos de RNA onde atua a DICER e ocorre um mecanismo muito semelhante aos siRNA (Shah & Schaffer 2011).

O RNAi apresenta diferentes e múltiplas aplicações possíveis, entre elas surge o combate ao vírus da Dengue, este afeta cerca de 100 países em todo o mundo e não há nenhum antiviral licenciado contra este agente (Idrees et al. 2013). Até à data, tem sido usado RNAi contra vários agentes patogénicos humanos, incluindo o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1, o vírus da hepatite C, o vírus da hepatite B, poliomielite, vírus da gripe A, entre outros. Estes vírus possuem ssRNA, quando o seu genoma é exposto no citoplasma da célula hospedeira tornam-se um potencial alvo do RNAi (Idrees et al. 2013).

A administração intravenosa de siRNA inibe o desenvolvimento tumoral (pulmonar) através da destruição do CD47, este é um “auto marcador” que é expresso na superfície das células cancerosas que lhe permite escapar ao sistema imunitário, deste modo as células ficam “visíveis” de tal modo que as torna alvos para os macrófagos (Y. Wang et al. 2013).

Estes são apenas alguns exemplos das inúmeras formas de explorar a ação do RNAi, sendo este de extrema importância num futuro próximo no que respeita á terapêutica antiviral.

Atualmente, dão-se ainda os primeiros passos na exploração do potencial do RNAi como antiviral, porém alguns contratempos têm surgido e assim dificultado os avanços científicos nesta área, exemplo disso mesmo é a depuração renal (se o RNAi for demasiado pequeno pode ser excretado na urina), as barreiras celulares que

Novas Moléculas Antivirais, Que Futuro?

dificultam a chega do RNAi ao local de ação, a biodisponibilidade, entre outros (Jiehua Zhou et al. 2013).

A escolha de vetores virais para administração do RNAi também tem encontrado alguns problemas, particularmente o risco de imunogenicidade. Para colmatar esta situação estuda-se as nanopartículas como forma alternativa de administração do RNAi com todas as vantagens que esta tecnologia pode oferecer a nível ambiental como custos de produção, reações alérgicas ou de imunogenicidade, entre outras. Os estudos têm caído sobre nanopartículas de ouro, micelas e outros materiais, mas aquelas que têm apresentado melhores resultados ao veicular o RNAi tem sido os lipossomas (Jiehua Zhou et al. 2013).

Apesar dos avanços científicos nesta área, o RNAi apresenta-se como uma opção terapêutica antiviral de elevada importância, com resultados prometedores, contudo a ciência depara-se ainda com diferentes dificuldades passíveis de serem ultrapassadas num sentido de otimizar esta tecnologia.

Capítulo V – Conclusão

A Virologia, área que se dedica ao estudo dos vírus, identificou algumas características como sendo gerais e comuns aos vírus, estes são parasitas intracelulares obrigatórios, possuem ácido nucleico (DNA ou RNA) e cápside, podem possuir ou não invólucro.

Os vírus acompanham os seres vivos desde sempre, provocando diferentes infecções e morte em inúmeras espécies. A ciência tem-se dedicado ao estudo destes parasitas por forma a tentar eliminar ou controlar certo vírus ou pelo menos minimizar os efeitos devastadores que estes podem ter sobre determinadas populações.

O desenvolvimento de novas moléculas antivirais tem-se revelado um processo lento e insuficiente face á evolução dos números no que respeita a infecções virais por todo o mundo, os estudos são caros e morosos. Contudo nas últimas décadas surgiram moléculas de extrema importância no combate às infecções virais.

Depois de uma análise sobre a importância dos vírus no mundo atual, este trabalho apresenta algumas moléculas com diferentes potenciais terapêuticos, mas todas elas com elevado interesse do ponto de vista antiviral.

Apesar do conhecimento já adquirido a busca de novas moléculas ou meios terapêuticos antivirais é um processo que para lá do supra descrito implica muita dedicação e paciência, mesmo as moléculas apresentadas necessitam de mais tempo e investigação para um total conhecimento do seu potencial terapeutico e efeitos indesejados.

Bibliografia

- Alter, M.J., 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG*, 13(17), pp.2436–41.
- Anon, Antiviral DRACO: protein transduction and primary cell apoptosis.[Accessed June 14, 2013a].
- Anon, Partícula viral – Wikipédia, a enciclopédia livre.[Accessed July 3, 2013b].
- Anon, Pequenas Coisas Considerado: Vírus no quarto.[Accessed July 3, 2013c].
- Aoki, M. et al., 2012. Loss of the protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) and its association with the acquisition of resistance to TPV by HIV-1. *Journal of virology*, 86(24), pp.13384–96.
- Arenzana-Seisdedos, F., 2008. [Viral entry as therapeutic target. Current situation of entry inhibitors]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26 Suppl 1, pp.5–11.
- Bartenschlager, R. et al., 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *Journal of virology*, 68(8), pp.5045–55.
- Chen, H. et al., 2013. Discovery of O-Alkylamino Tethered Niclosamide Derivatives as Potent and Orally Bioavailable Anticancer Agents. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(2), pp.180–185.
- Debing, Y., Jochmans, D. & Neyts, J., 2013. Intervention strategies for emerging viruses: use of antivirals. *Current opinion in virology*, 3(2), pp.217–24.
- Dumond, J. et al., 2013. Pharmacokinetics of two common antiretroviral regimens in older HIV-infected patients: a pilot study. *HIV medicine*.
- Enquist, L.W., 2009. Virology in the 21st century. *Journal of virology*, 83(11), pp.5296–308.
- Fried, M.W. et al., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 347(13), pp.975–82.

- Han, J. et al., 2012. Function of glycoprotein E of herpes simplex virus requires coordinated assembly of three tegument proteins on its cytoplasmic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(48), pp.19798–803.
- Hensley, P., Mishra, M. & Kyprianou, N., 2013. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biological chemistry*.
- Hood, J.L. et al., 2013. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral therapy*, 18(1), pp.95–103.
- Idrees, S., Ashfaq, U.A. & Khaliq, S., 2013. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(3), pp.232–6.
- Imaz, A. & Podzamczar, D., 2012. The Role of Rilpivirine in Clinical Practice: Strengths and Weaknesses of the New Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor for HIV Therapy. *AIDS reviews*, 14(4), pp.268–78.
- Imperi, F. et al., 2013. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(2), pp.996–1005.
- Jane S. Flint, Vincent R. Racaniello, Robert Krug, SJ Flint, LW Enquist, AM Skalka, VR Racaniello, K.R., 2009. *Principles of Virology, Vol. 1: Molecular Biology: S. Jane Flint, Lynn W. Enquist, Vincent R. Racaniello* 3rd ed.,
- Jurgeit, A. et al., 2012. Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects. *PLoS pathogens*, 8(10), p.e1002976.
- Kofman, A. V et al., 2013. The p53-microRNA-34a axis regulates cellular entry receptors for tumor-associated human herpes viruses. *Medical hypotheses*.
- Kolman, M. et al., The increasing impact of human immunodeficiency virus infections, sexually transmitted diseases, and viral hepatitis in Durham County, North Carolina: a call for coordinated and integrated services. *North Carolina medical journal*, 72(6), pp.439–46.
- Kotton, C.N., 2013. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13 Suppl 3, pp.24–40; quiz 40.

- Lee, N. et al., 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *The New England journal of medicine*, 348(20), pp.1986–94.
- Liu, Hongyan et al., 2013. Construction and expression of sTRAIL-melittin combining enhanced anticancer activity with antibacterial activity in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(7), pp.2877–84.
- Liu, Mingjun et al., 2013. A novel melittin-MhIL-2 fusion protein inhibits the growth of human ovarian cancer SKOV3 cells in vitro and in vivo tumor growth. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62(5), pp.889–95.
- Londoño, M.-C., Crespo, G. & Forns, X., 2013. Pretransplant and posttransplant treatment of hepatitis C virus infection with protease inhibitors. *Current opinion in organ transplantation*, 18(3), pp.271–8.
- Mateu, M.G., 2012. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Odaibo, G.N., Ola, S.O. & Olaleye, O.D., 2012. Hepatitis B virus DNA in patients with HBsAg in South Western Nigeria. *Journal of medical virology*.
- Pagano, J.S. et al., 2004. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Seminars in cancer biology*, 14(6), pp.453–71.
- Pan, J.-X., Ding, K. & Wang, C.-Y., 2012. Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells. *Chinese journal of cancer*, 31(4), pp.178–84.
- Pan, Q. et al., 2012. Telaprevir/boceprevir era: from bench to bed and back. *World journal of gastroenterology : WJG*, 18(43), pp.6183–8.
- Peterlin, B.M. & Trono, D., 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature reviews. Immunology*, 3(2), pp.97–107.
- Plosker, G.L., 2013. Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Fumarate: A Review of its Use in HIV-1 Pre-Exposure Prophylaxis. *Drugs*, 73(3), pp.279–91.
- Pol, S et al., 2013. Rapid progression of antiviral treatments of chronic hepatitis C virus infection. *Minerva gastroenterologica e dietologica*, 59(2), pp.161–72.

- Portugal, R., Leitão, A. & Martins, C., 2009. Apoptosis in porcine macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) strains with different virulence. *Archives of virology*, 154(9), pp.1441–50.
- Qashqari, H. et al., 2013. Understanding the molecular mechanism(s) of Hepatitis C Virus (HCV) induced interferon resistance. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*.
- Rider, T.H. et al., 2011. Broad-spectrum antiviral therapeutics. *PloS one*, 6(7), p.e22572.
- Rizzardini, G. et al., 2012. Cost of human immunodeficiency virus infection in Italy, 2007-2009: effective and expensive, are the new drugs worthwhile? *ClinicoEconomics and outcomes research : CEOR*, 4, pp.245–52.
- Sack, U. et al., 2011. Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(13), pp.1018–36.
- Shah, P.S. & Schaffer, D. V, 2011. Antiviral RNAi: translating science towards therapeutic success. *Pharmaceutical research*, 28(12), pp.2966–82.
- Shaikh, F.Y. & Crowe, J.E., 2013. Molecular mechanisms driving respiratory syncytial virus assembly. *Future microbiology*, 8, pp.123–31.
- Shang, L., Lin, K. & Yin, Z., 2013. Resistance Mutations Against HCV Protease Inhibitors and Antiviral Drug Design. *Current pharmaceutical design*.
- Simmonds, P., 1999. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of hepatology*, 31 Suppl 1, pp.54–60.
- Sulkowski, M. et al., 2013. Boceprevir versus placebo with pegylated interferon alfa-2b and ribavirin for treatment of hepatitis C virus genotype 1 in patients with HIV: a randomised, double-blind, controlled phase 2 trial. *The Lancet infectious diseases*.
- Torii, H. et al., 2013. Dermatological side-effects of telaprevir-based triple therapy for chronic hepatitis C in phase III trials in Japan. *The Journal of dermatology*.

- Villar, E. & Barroso, I.M., 2006. Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. *Glycoconjugate journal*, 23(1-2), pp.5–17.
- Wang, Y. et al., 2013. Intravenous Delivery of siRNA Targeting CD47 Effectively Inhibits Melanoma Tumor Growth and Lung Metastasis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*.
- Wild, P. et al., 2002. The significance of the Golgi complex in envelopment of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) as revealed by cryobased electron microscopy. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 33(4), pp.327–37.
- Wu, C.-J. et al., 2004. Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication by niclosamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), pp.2693–6.
- ZEUZEM, S., 2004. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3*1, *2. *Journal of Hepatology*, 40(6), pp.993–999.
- Zhou, Jiehua et al., 2013. Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(1), pp.85–107.