

BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia

Prof. Armando Ventura

Apostila de Virologia

Replicação viral

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e sua forma extracelular tem a propriedade de interagir com o hospedeiro. Para se multiplicar, um vírus precisa replicar seu genoma e para isso, tem que infectar células alvo acessíveis no organismo hospedeiro. A célula que apresenta receptores específicos para interação com o vírus é considerada **susceptível**. Se além disso, a célula apresenta fatores celulares que permitam a replicação eficiente do vírus, ela é considerada **permissiva**. Para completar seu **ciclo infeccioso** o vírus precisa ter **acesso** a outras células susceptíveis e permissivas no organismo hospedeiro. A interação com elementos do **sistema imunológico** do organismo hospedeiro é um fator importante para a progressão do ciclo infeccioso, determinando o **estabelecimento, eliminação ou persistência** da infecção. Essa interação, irá então determinar se a infecção será **produtiva** (produção de progênie viral viável) ou **abortiva** (ciclo replicativo viral interrompido).

As etapas da multiplicação viral são: Adsorção / Ligação, Penetração, Desnudamento, Expressão e replicação do genoma viral, Montagem / Maturação, e Liberação (**Fig 1**).

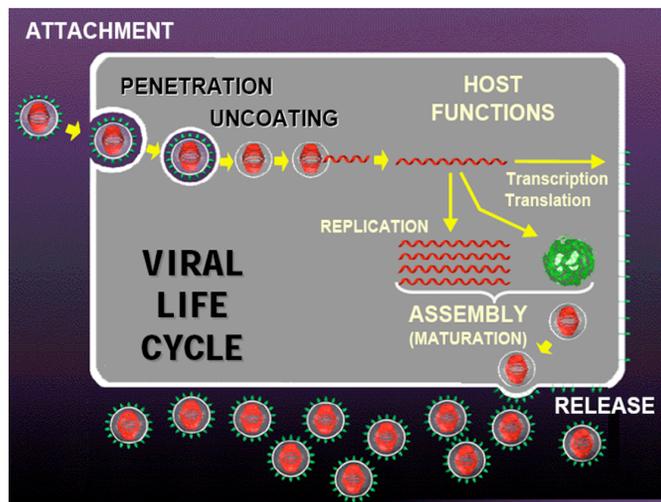


Fig 1.

Adsorção / Ligação

A primeira etapa da replicação dos vírus é o contato com a superfície das células a serem infectadas. Através de uma “**porta de entrada**” no hospedeiro os vírus atingem um tecido alvo em que as células são suscetíveis à infecção (**Fig 2**). Os vírus presentes nesse ambiente, por exemplo o lúmen intestinal ou alvéolos pulmonares, podem ficar adsorvidos ao epitélio de maneira inespecífica (**adsorção**). Se o vírus possuir na superfície uma proteína capaz de reconhecer um receptor presente nas células, haverá uma **ligação** desse **anti-receptor** com o **receptor** celular (**Fig 3**).

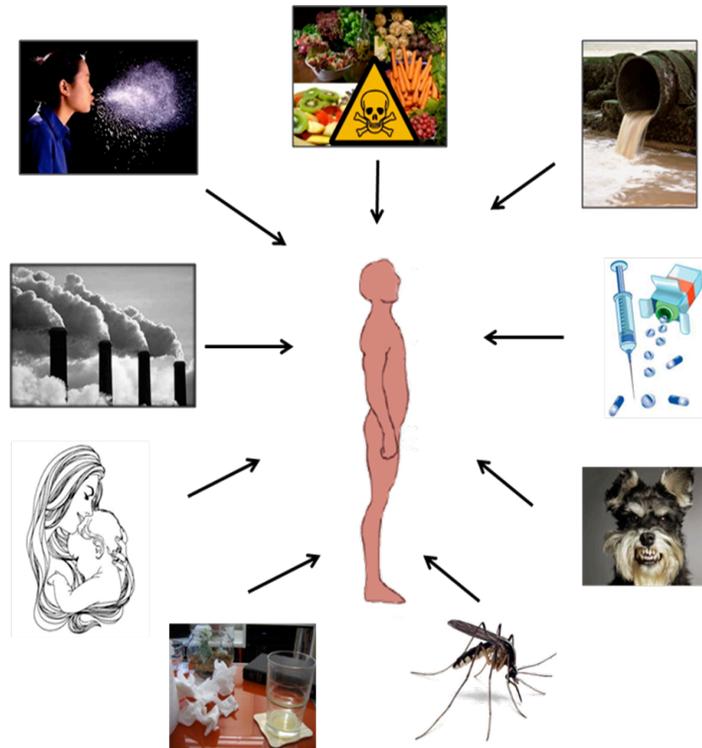
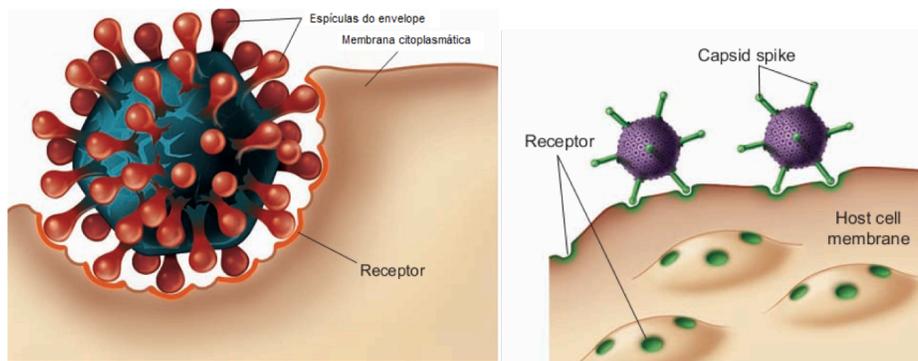


Fig 2. Portas de entrada. Começando pela figura do topo no sentido horário. Trato digestivo: alimentos ou água contaminados. Lesão de pele: drogas injetáveis, mordidas de animais ou picadas de insetos. Pele e mucosas: contato com fômites (objetos contaminados) ou com a pele de indivíduos doentes (aleitamento, relações sexuais). Vias respiratórias: partículas ou gotículas em suspensão.



Interação entre o anti-receptor viral e o receptor celular geram **especificidade e tropismo**.

Fig 3. Ligação do vírion a receptores específicos da célula hospedeira

Como exemplos de receptor celular e anti-receptor presente no vírion, podemos citar o CD4 nos linfócitos T4 e a gp120 no envelope do HIV, ou o ácido siálico nas células de epitélio de vias aéreas e a hemaglutinina na superfície do vírus influenza. Essas interações ditam a especificidade, e assim a **gama de hospedeiros** (conjunto de espécies animais ou diferentes linhagens celulares suscetíveis e permissivas que pode ser infectadas por um vírus). Outro conceito relacionado ao reconhecimento dos receptores, e utilizado com frequência, é o **tropismo** (predileção por células de alguns tecidos).

Penetração, Desnudamento

Após as etapas de adsorção e ligação, deve haver a **penetração** do vírus no citoplasma celular. O contato íntimo do vírion com a membrana citoplasmática leva, na maioria dos casos, à **endocitose** da partícula viral. A endocitose ocorre no caso dos vírus não envelopados e também pode ocorrer para os vírus envelopados. Uma alternativa para os vírus envelopados é a **fusão** direta do envelope com a membrana citoplasmática (**fusão de membranas**). Existem ainda alguns vírus que injetam somente seu material genético na célula hospedeira, um mecanismo chamado **translocação** (Fig 4).

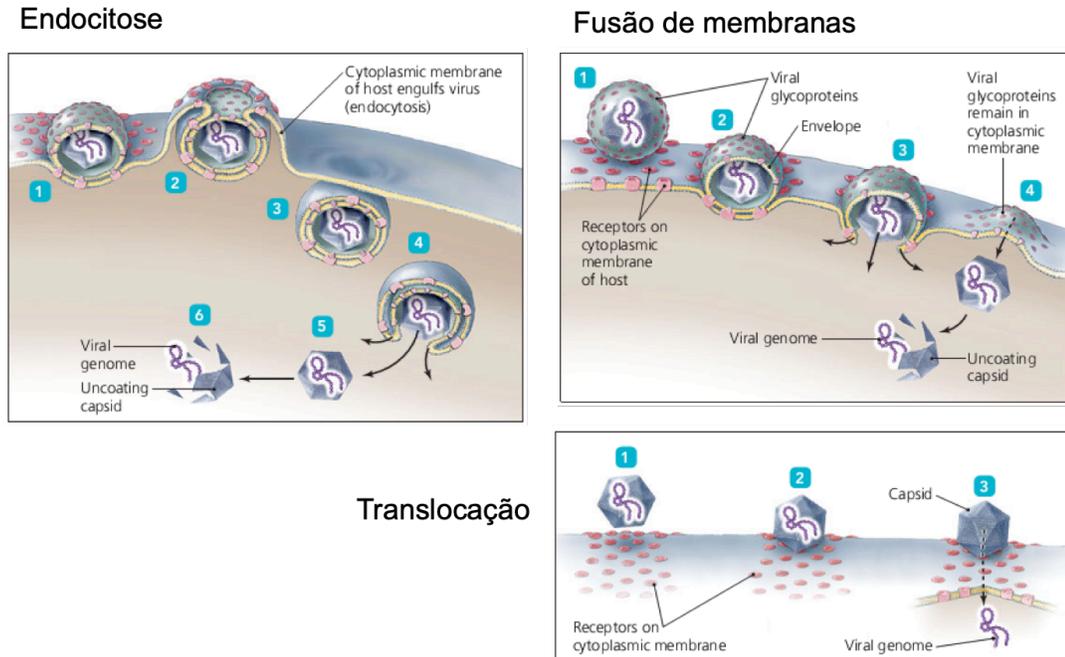


Fig 4. Mecanismos de penetração na célula hospedeira

A seguir haverá um processo de liberação do genoma viral no citoplasma, ou **desnudamento** (“uncoating”). No caso da fusão o capsídeo é liberado diretamente no citoplasma, e na endocitose o capsídeo sairá da vesícula endossomal por fusão com o envelope viral. Estando o capsídeo liberado no citoplasma o genoma deve ser desnudado, sendo que para a translocação isso ocorre diretamente (Fig 4). Os mecanismos de desnudamento variam com o tipo de genoma e serão comentados adiante.

Replicação do genoma e síntese das proteínas virais

Depois da penetração na célula, sucede-se um período em que não é possível detectar partículas virais (Fig 5). Este é chamado de **período de eclipse**, quando ocorrem os primeiros ciclos de expressão dos genomas virais, que é seguido por um rápido aumento dos vírus presentes no meio de cultivo, reflexo de um período de crescimento que se estabiliza quando as células estão destruídas. A curva de crescimento viral apresentada à Fig 5 pode ser obtida experimentalmente para a maioria dos vírus animais, quando dispomos de uma célula em cultura suscetível e conseguimos titular o estoque viral.

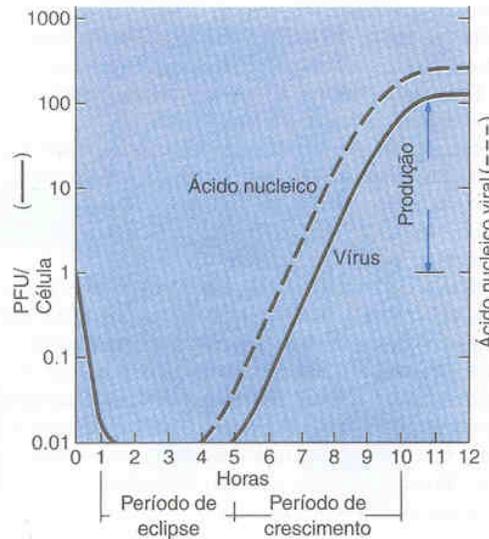


Fig 5. Curva de crescimento viral

Um ponto chave para entendermos as diferentes estratégias de replicação é o fato de que todo vírus em algum momento **precisa de RNAs mensageiros**, para que suas proteínas sejam sintetizadas. Assim, ocorrem diferentes estratégias de replicação para cada tipo de genoma viral, que foram organizadas por David Baltimore em grupos (**Fig 6**). Além de produzir mRNAs para efetivar a expressão gênica, outro aspecto importante é de que os vírus também têm que multiplicar seus genomas. Assim, haverá necessidade de intermediários, dependendo do genoma viral considerado.

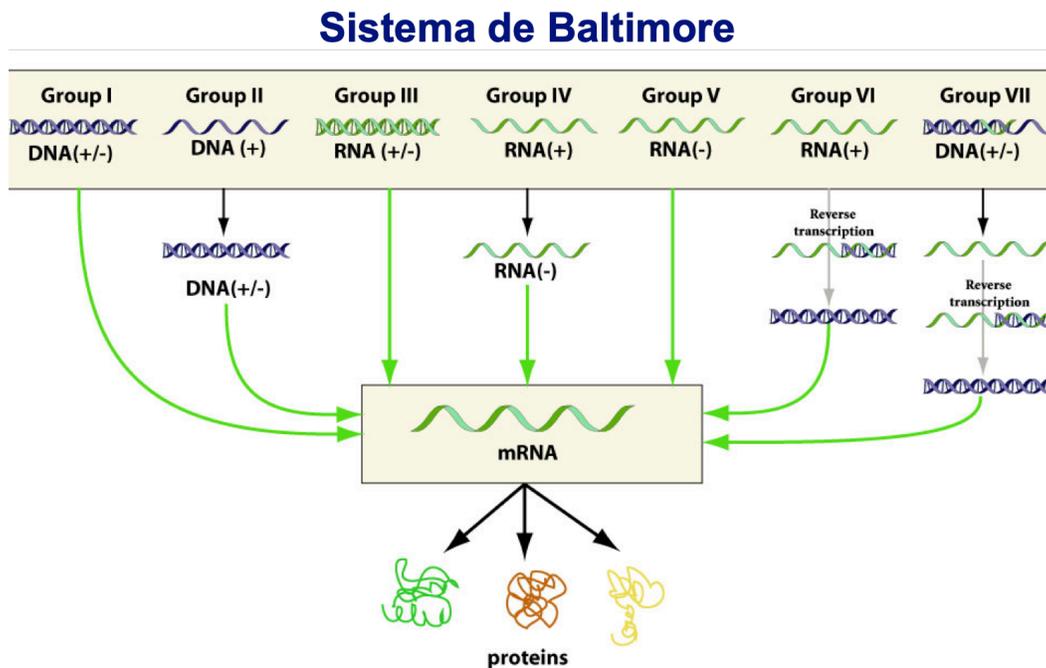


Fig 6. O mecanismo de replicação utilizado pelo vírus depende da natureza de seu genoma.

Grupo I

A replicação do genoma da maioria das famílias dos vírus do grupo I (DNA fita dupla) é feita no núcleo. Temos como exemplos *Papoviridae*, *Adenoviridae* e *Herpesviridae* mencionadas na primeira aula. A exceção é a família *Poxviridae*, cuja replicação ocorre no citoplasma, comentada adiante.

Utilizaremos como exemplo de replicação desse grupo os adenovírus. À **Fig 7** temos um esquema da replicação dos adenovírus, começando pelo reconhecimento do receptor, endocitose, liberação do capsídeo no citoplasma, e seu transporte para um poro nuclear onde ocorre a inserção do genoma viral (em azul) no núcleo (1, 2, 3 e 4). No núcleo o genoma viral estará interagindo com fatores de transcrição celulares. Ocorre então a expressão de um conjunto inicial de genes virais (mRNAs em verde), o que é chamado de **transcrição imediata precoce** (immediate early, 5, 6, 7, 8 e 9). Os genes virais dessa fase codificam proteínas tipicamente regulatórias (blocos marrom), que são importadas para o núcleo, para coordenar a expressão dos genes virais, mas que podem também interferir em funções celulares. Na fase seguinte ocorre a **transcrição imediata** (early) em que temos então a síntese de proteínas envolvidas na replicação do genoma viral (blocos azuis) incluindo a DNA polimerase viral (Pol) que são importadas para o núcleo, para fazer cópias do genoma (em magenta) (10, 11, 12, 13). Na ultima fase ocorre a **transcrição tardia** (Late) em que temos a síntese das proteínas estruturais (blocos amarelos), que são também importadas para o núcleo. Ocorre então a montagem dos capsídeos por essas proteínas, que incorporam os novos genomas, ocorrendo um processo de maturação das partículas virais no núcleo (etapas 14 a 20). Finalmente com o acúmulo de partículas virais, ocorre a ruptura do núcleo e da célula e liberação dos novos adenovírus (21).

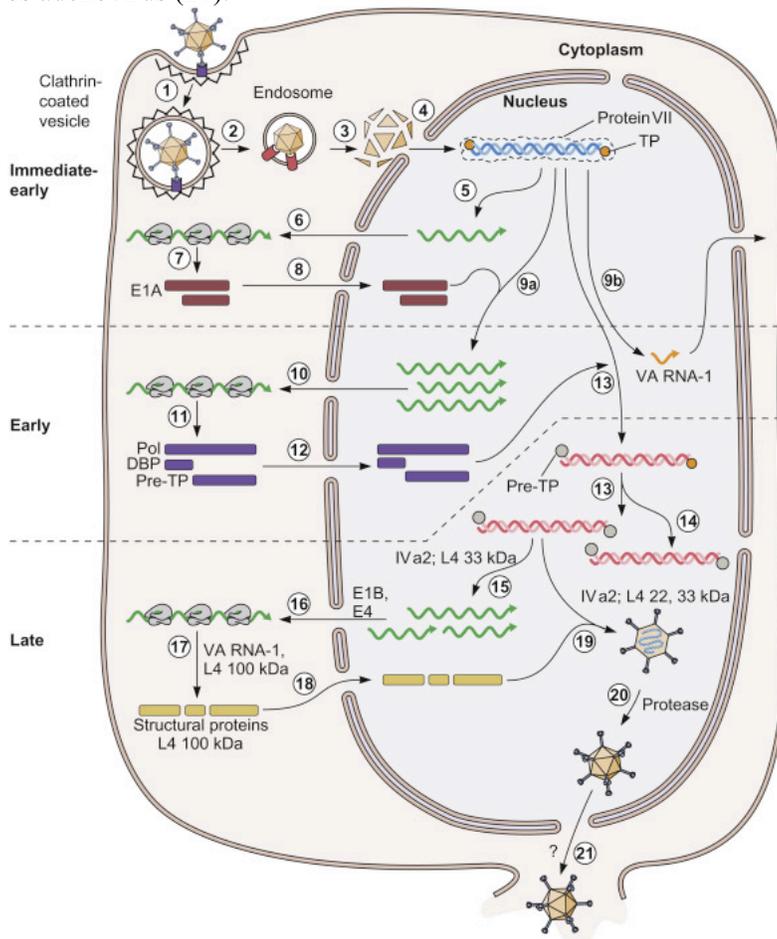


Fig 7

Características importantes da replicação dos adenovírus são: a) utilizam a RNA pol II celular para transcrição do seu genoma, b) codificam sua própria DNA polimerase, e c) o genoma viral, DNA dupla fita linear, tem proteínas covalentemente ligadas às extremidades 5' (ver TPs, “terminal proteins”, na etapa 5 da Fig 7), e essas proteínas servem como “primer” para início da síntese de DNA pela polimerase viral.

A descrição do processo de replicação dos vírus humanos com genoma de DNA fita dupla é feita sempre subdividindo em etapas, precoce, intermediária e tardia, com variações nessa denominação como é o caso dos adenovírus. Esses vírus inserem seus genomas no núcleo das células infectadas, sendo a exceção dentre poxvírus (Ex: varíola, vaccínia). Os poxvírus com genomas muito grandes, têm independência maior com relação às funções nucleares. Eles têm por exemplo as suas próprias DNA e RNA polimerases, e fazem o processo de replicação no citoplasma, deixando o núcleo das células intacto. No entanto, também apresentam as fases características da replicação de DNA fita dupla (precoce, intermediária e tardia), cada uma com um conjunto próprio de genes expressos.

Grupo II

Utilizaremos como exemplo de replicação do grupo II o parvovírus B19 humano da família *Parvoviridae*. Os genomas dos vírus desse grupo são de DNA fita simples, e a sua replicação requer a formação de um intermediário de DNA dupla fita. Esse intermediário é formado bem cedo após a infecção e inserção do genoma no núcleo em processo similar ao descrito para os adenovírus. À **Fig. 8**, temos que após o desnudamento (“uncoating”), as DNA polimerases da célula hospedeira envolvidas na "reparação" de regiões de DNA fita simples, transformam o genoma viral em dupla fita. O genoma codifica proteínas estruturais (VPs), e uma recombinase (Rep) que **insere o genoma do vírus no genoma celular**, e posteriormente dele retira fitas simples durante a replicação (**Fig. 8**). Esse processo é repetido inúmeras vezes, gerando tanto genomas de polaridade positiva quanto negativa, dependendo de qual fita de DNA é excisada. A partir do genoma viral integrado ao celular, são transcritos mRNAs que codificam VP1, VP2 e Rep, que após a tradução são importadas para o núcleo. As VPs formam capsídeos que incorporam os genomas, havendo acúmulo de partículas virais no núcleo até que as membranas nucleares e a citoplasmática são rompidas liberando os vírus maduros (**Fig. 8**).

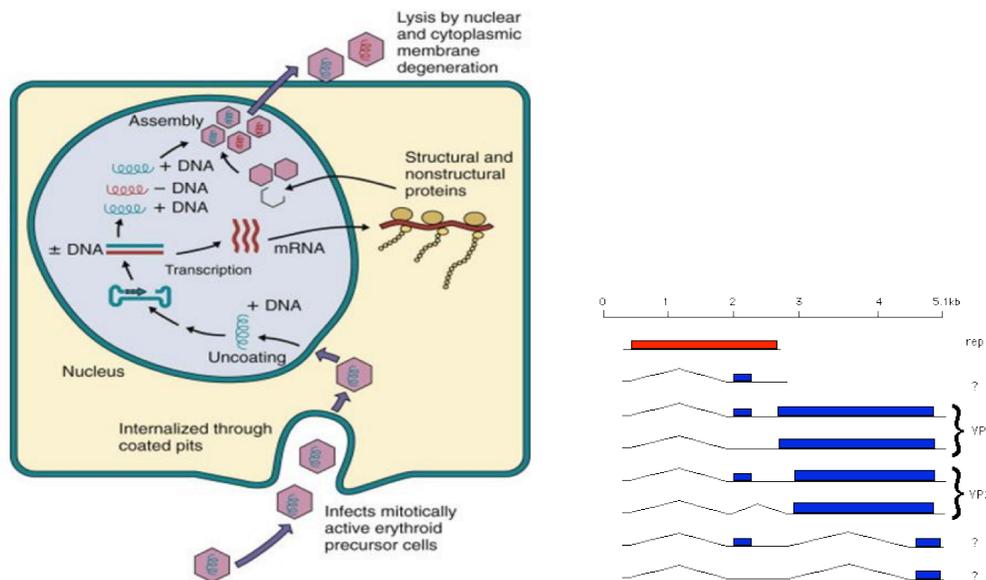


Fig 8. Ciclo de replicação dos parvovírus e proteínas que seu genoma codifica.

Características importantes desses vírus são a replicação nuclear dependente de enzimas celulares e a propriedade de integrar seu genoma ao genoma celular. Esta propriedade vem sendo explorada para utilizar outros vírus humanos dessa família, os *adeno associated virus* (AAVs), em terapia genica.

Grupo III

A replicação do genoma das famílias dos vírus do grupo III (RNA fita dupla) é feita no citoplasma. Utilizaremos como exemplo os rotavírus humanos, pertencentes à família *Reoviridae*, mencionada na primeira aula, que possuem genoma de 11 segmentos. Após a entrada nas células por endocitose ocorre a formação de endossomos contendo proteases e meio com baixo pH. Isso modifica a estrutura dos capsídeos que rompem os endossomos, liberando capsídeos no citoplasma, sem as camadas mais externas, que assim ficam permeáveis à entrada de ribonucleotídeos (**Fig 9**).

A partícula do rotavírus carrega RNA polimerases dependentes de RNA, as quais sintetizam RNA+ (fita simples) a partir do RNA de fita dupla no interior dos capsídeos. Estas moléculas de RNA+ fita simples são exportadas dos capsídeos e irão atuar como mRNA, para a síntese de proteínas virais. Essas proteínas são de dois tipos: não estruturais (NSs), que atuam inibindo a resposta celular antiviral e criando microambientes propícios à montagem das partículas virais; e estruturais (VPs) que constituirão os capsídeos (**Fig 9**).

Além disso, as fitas RNA+ (fita simples) exportadas do capsídeo que penetrou na célula, também serão capturadas para o interior dos capsídeos que estão sendo montados, e junto com elas novas RNA polimerases dependentes de RNA. Essas moléculas RNA+ serão utilizadas como moldes para a síntese de fitas complementares (RNA-), recompondo os genomas de RNA dupla fita dentro das novas partículas virais (**Fig 9**). Dessa forma ocorre o processo de replicação do genoma viral sem expô-lo no citoplasma, o que é importante para o vírus pois RNA de fita dupla dispara uma forte resposta antiviral.

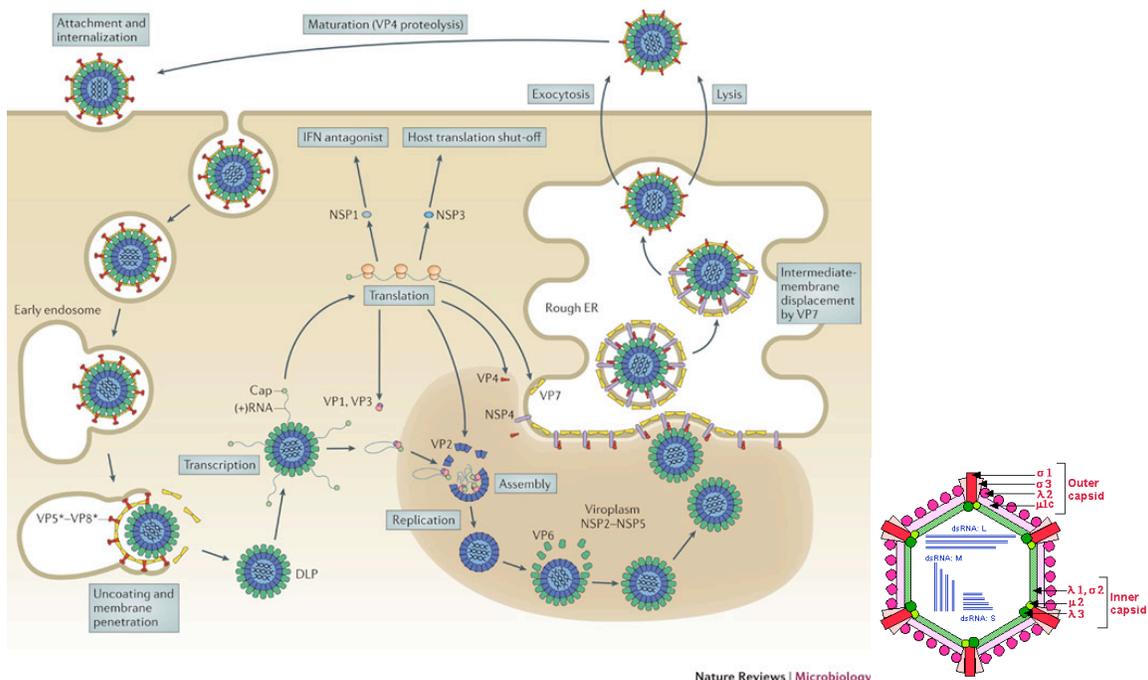


Fig 9. Ciclo de replicação do rotavírus e esquema detalhado da partícula viral

Após a síntese dos genomas virais o capsídeo adquire uma nova camada (VP6 em verde, embaixo do esquema à direita), e a seguir adquirir a camada final de proteínas de membrana por brotamento para o interior do retículo endoplasmático. As partículas maduras são então exocitadas (Fig 9). Características importantes desses vírus são: o fato de possuírem genoma RNA dupla fita segmentado, e de a partir de cada segmento ser transcrito um mRNA monocistrônico; e da replicação ser citoplasmática com o genoma sempre protegido da exposição ao sistema antiviral inato das células.

Grupo IV

A replicação do genoma das famílias dos vírus do grupo IV (RNA fita simples positivo, RNA+) é feita no citoplasma. Utilizaremos como exemplo os poliovírus humanos, pertencentes à família *Picornaviridae*. Exemplos de outras famílias de vírus do grupo IV com patógenos de importância em humanos são: *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae*.

O poliovírus liga-se ao receptor, sofrendo uma modificação estrutural que permite inserir seu genoma no citoplasma celular por translocação. Uma característica importante desse genoma (em verde) é que ele tem uma proteína (VPg, em amarelo) ligada covalentemente à extremidade 5', o que leva a sua estabilidade (Fig 10).

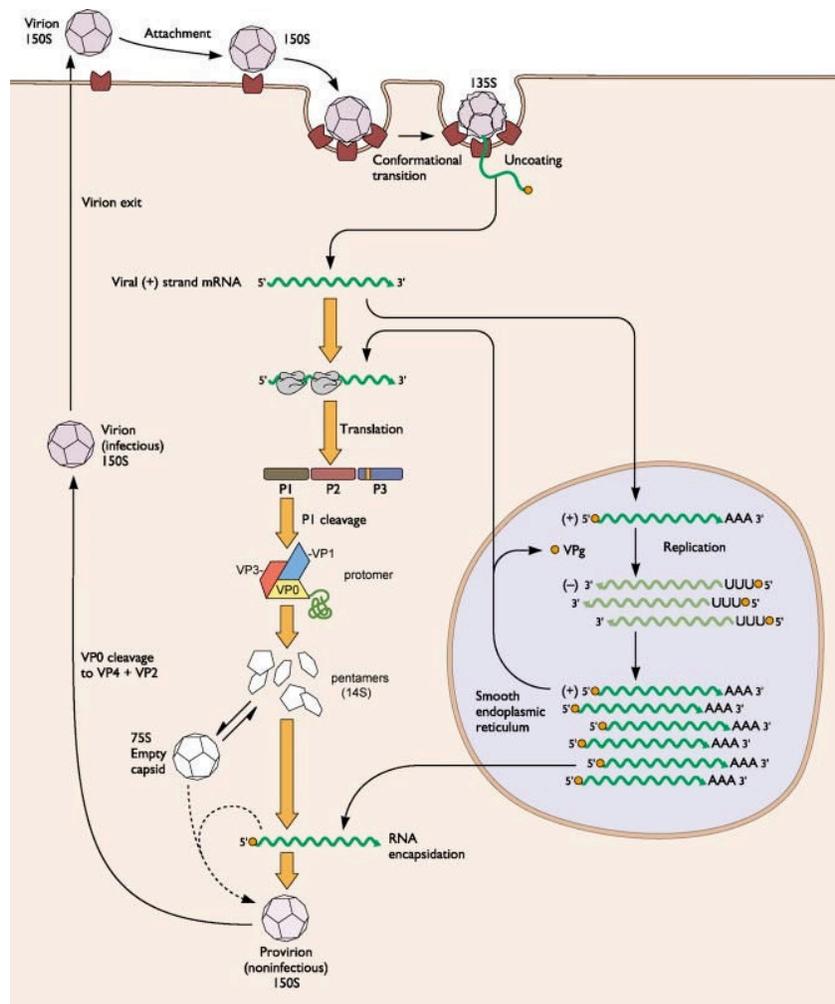


Fig 10. Ciclo de replicação do vírus da poliomielite.

O genoma RNA+ dos poliovírus funciona como mRNA e ao entrar na célula pode ser utilizado imediatamente pelos ribossomos, para traduzir uma poliproteína. Essa poliproteína será subdividida em peptídeos funcionais (inicialmente P1, 2 e 3) por proteases virais (Pro) contidas na própria poliproteína inicial (**Fig 11**). O peptídeo P1 será então clivado nas VPs, proteínas estruturais que constituirão o capsídeo num processo de montagem (**Fig 10**).

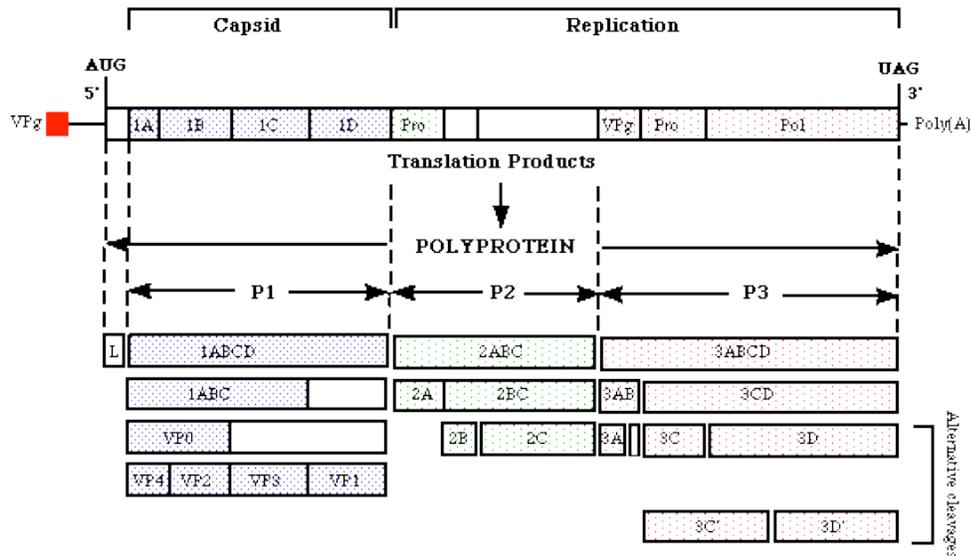


Fig 11. Genoma e poliproteína do vírus da poliomielite.

A **RNA polimerase RNA-dependente** viral (Pol, no peptídeo P3 à Fig 11) codificada no genoma e produzida no primeiro ciclo de tradução, irá então atuar na fita de RNA+ original, gerando um RNA negativo molde (RNA-). Esse molde servirá para essa mesma enzima produzir mais fitas RNA+ que serão incorporadas às novas partículas virais constituídas pelas VPs em maturação (**Fig 10**). O acúmulo de partículas virais no citoplasma leva a célula à lise, liberando os vírus no meio. Esse tipo de genoma viral é dito infeccioso, ou seja se for inoculado artificialmente no citoplasma de uma célula, dará origem a partículas virais, devido à essa estratégia de replicação.

Características importantes desses vírus são: o fato de possuírem genoma RNA+ que se comporta como mRNA; algumas famílias do grupo IV de Baltimore possuem um padrão complexo de transcrição (ex. *Togaviridae*).

Grupo V

A replicação do genoma das famílias dos vírus do grupo V (RNA fita simples negativo, RNA-) é feita na maioria dos casos no citoplasma. Utilizaremos como exemplo o vírus da raiva, pertencente à família *Rabdoviridae*. As famílias de vírus do grupo V com genoma não segmentado são: *Paramixoviridae*, *Filoviridae*, e *Rabdoviridae*. *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Arenaviridae* possuem genomas segmentados. Em todas há patógenos de importância em humanos. Os ortomixovírus replicam no núcleo como será detalhado na aula sobre Influenza.

O vírus da Raiva possui envelope com glicoproteínas, que reconhecem o receptor celular levando à endocitose, seguindo-se a fusão do envelope viral à membrana do endossomo e

desnudamento do genoma (nucleocapsídeo helicoidal) liberado no citoplasma, etapas 1 a 4 da **Fig 12**. Se considerarmos que o genoma é de RNA-, a tradução das proteínas virais não é possível de imediato, esse genoma tem que ser transcrito. Para tanto, é necessário que na partícula viral seja transportada uma RNA polimerase RNA-dependente, que fará a transcrição de mRNAs monocistrônicos para que possam ser traduzidas as proteínas virais (inserto superior à direita e etapa 6 da Fig 12).

Além das proteínas estruturais de envelope e capsídeo (etapas 6 a 10 da Fig 12), teremos mais RNA polimerases capazes de converter a fita genômica RNA- numa fita RNA+ **complementar** a todo o genoma. Esta será o molde para a síntese das fitas RNA- que se constituirão nos genomas das novas partículas virais (inserto inferior à direita e etapa 5 da Fig 12). Os novos genomas associam-se à nucleoproteína, formando o nucleocapsídeo helicoidal, que se liga à proteína de matriz e seguem para a membrana citoplasmática onde estão ancoradas as glicoproteínas do envelope viral seguindo-se o brotamento da partícula viral completa (etapas 11 a 13 da Fig 12).

Uma característica importante desses vírus é o fato de possuírem genoma RNA- que deve ser transcrito em mRNAs após o desnudamento, havendo a necessidade do transporte de uma RNA polimerase RNA-dependente na partícula viral. Esse tipo de genoma viral é dito não infeccioso, ou seja se for inoculado artificialmente no citoplasma de uma célula, não dará origem a partículas virais.

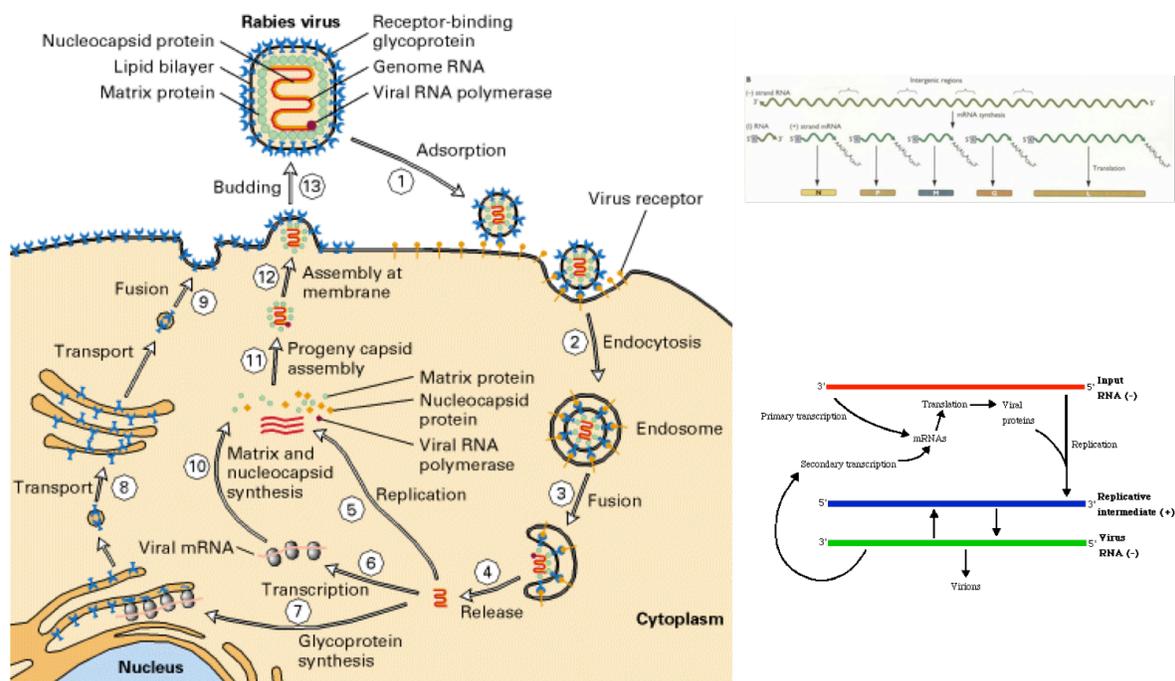


Fig 12. Ciclo replicativo do vírus da raiva, transcrição e replicação do genoma.

Grupo VI

A replicação do genoma do grupo VI (RNA fita simples positivo, envolvendo intermediário de DNA) é feita com um passo de integração do genoma viral ao celular, característico da família *Retroviridae*.

Os Retrovírus são envelopados e após as glicoproteínas de envelope interagirem com receptores, entram por fusão ou endocitose e liberam seus capsídeos no citoplasma das células hospedeiras. As duas cópias do seu genoma (dois mRNAs) são então submetidas ao processo de transcrição reversa (RNA → DNA) pela enzima transcriptase reversa que está no interior do capsídeo, culminando na formação de um DNA dupla fita (passos esquematizados do lado esquerdo à **Fig 13**). Esse DNA dupla fita forma um complexo com outra enzima viral a integrase, sendo que esse complexo transportado para o núcleo da célula insere o genoma viral no genoma celular. Esse genoma viral dupla fita de DNA passa a ser chamado de pro-vírus e dele são transcritos mRNAs pela RNAPol II celular. Esses mRNAs são traduzidos nas proteínas de capsídeo e envelope do vírus, que passa a brotar da membrana citoplasmática (**Fig 13**). Discutiremos em maior detalhe a replicação do HIV em aula dedicada aos Retrovírus.

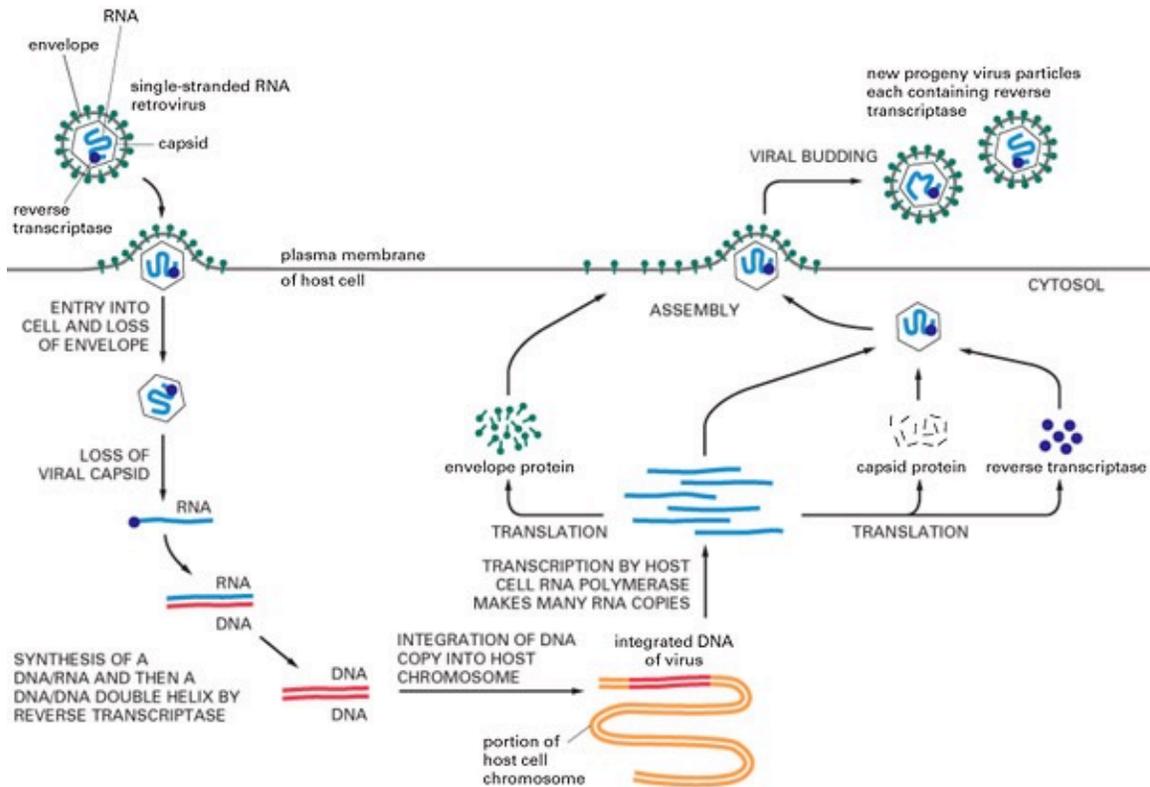


Fig 13. Ciclo de replicação dos retrovírus

Uma característica importante desses vírus é o fato de ocorrer um passo de transcrição reversa no início do ciclo replicativo, seguido da integração no genoma da célula hospedeira.

Grupo VII

A replicação dos vírus do grupo VII (genoma DNA dupla fita com trecho fita simples, envolvendo intermediário de RNA) é feita com um passo de transcrição reversa para gerar o genoma viral, característico da família *Hepadnaviridae*.

Os hepaDNAvírus (hepatite B humano, HBV) carregam na partícula viral um genoma de DNA dupla fita com regiões fita simples e restos de RNA. Esse genoma é inserido no núcleo das células hospedeiras, sendo reparado e circularizado (cccDNA), para posteriormente ser transcrito produzindo os mRNAs virais (**Fig 14**). No entanto, é também gerado um “RNA total” (pgRNA) que

ao chegar no citoplasma é encapsidado junto com a polimerase no processo de montagem da partícula viral, formando o nucleocapsídeo. Dentro do nucleocapsídeo esse RNA serve de molde para a síntese do genoma viral (DNA), por um processo de transcrição reversa, feito pela polimerase viral (Pol). Esse processo de transcrição reversa seguido da síntese da fita complementar (+*strand*) deixa as falhas observadas no genoma (**Fig 14**). Esse nucleocapsídeo pode então ser encaminhado ao núcleo para formar mais cccDNAs virais (aumentando a eficiência da replicação), ou para brotar para o interior do complexo de Golgi, adquirindo o envelope que contém a proteína de superfície dos HBVs (antígeno de superfície do HBV ou HBsAg). Os HBsAgs têm a propriedade de brotar espontaneamente para o interior do complexo de Golgi, gerando partículas virais vazias. Tanto o vírus completo (partículas de Dane) quanto as partículas virais vazias são excretados através das vias secretórias (**Fig 14**).

Comparando com os Retrovírus, temos nos dois casos a obrigatoriedade da passagem por um intermediário de DNA dupla fita, gerado pelo processo de transcrição reversa, em que RNA é convertido em DNA. A diferença entre essas duas formas de replicação é que a transcrição reversa ocorre na entrada na célula para os retrovírus (genoma de RNA na partícula viral), e na saída para os hepaDNAvírus (genoma de DNA na partícula viral).

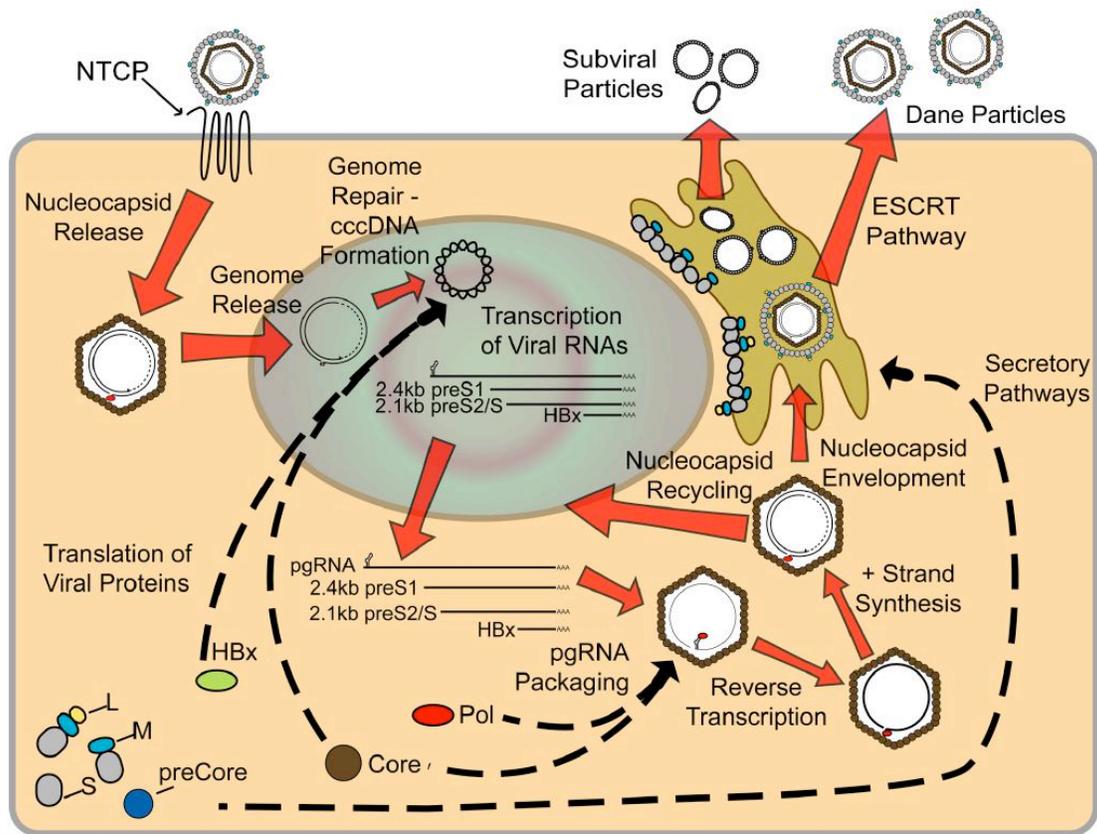


Fig 14. Ciclo de replicação dos HepaDNAvírus

Montagem e liberação das partículas virais.

Os processos de montagem e liberação foram comentados para cada um dos grupos da classificação de Baltimore, mas podemos resumir seus princípios básicos. Após o acúmulo de proteínas estruturais e genomas virais em quantidade suficiente, inicia-se a **montagem** das

partículas virais em capsídeos ou nucleocapsídeos, helicoidais ou icosaédricos, como vimos ao discutir a estrutura dos vírus. A **liberação** das partículas virais ocorre então de duas formas, falando genericamente. Os vírus não envelopados libertam-se das estruturas celulares pela **lise** da célula após acumularem-se no núcleo ou no citoplasma, como é o caso dos poliovírus (**Fig 15**).

Já os vírus envelopados têm que fazer um **brotamento** através de regiões da membrana citoplasmática ou internas, como a nuclear (herpes) ou do Golgi (pox) em que foram inseridas as proteínas virais de envelope (**Fig 16**). Para que esse processo ocorra com precisão deve haver o reconhecimento de onde essas proteínas estão localizadas, o que se dá através de interações proteína-proteína, como no processo de montagem dos capsídeos.

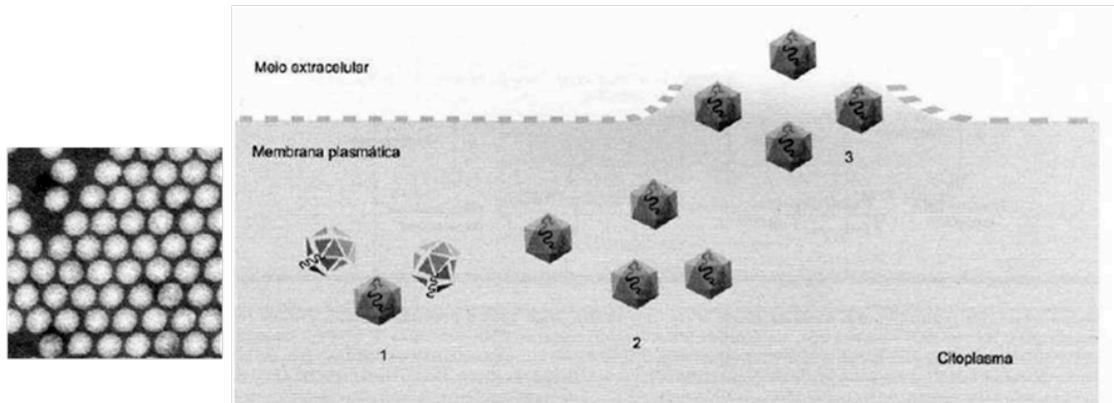


Fig 15. Liberação por lise

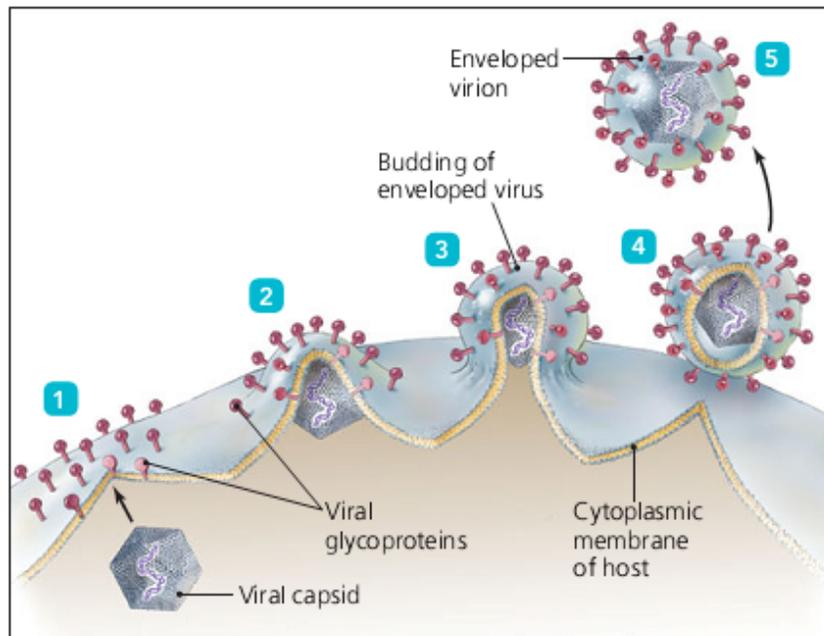


Fig 16. Liberação por brotamento