

Replicação viral

- Para um vírus se replicar, deve induzir uma célula hospedeira viva a sintetizar todos os componentes essenciais à produção de mais vírus.
- Replicação é dividida em 5 etapas:
 - 1) **Ligação/Adsorção**
 - 2) **Penetração**
 - 3) Síntese de ácidos nucleicos e proteínas virais/**Biossíntese**
 - 4) **Maturação** = Montagem dos capsídeos + empacotamento
 - 5) **Liberação** de vírions maduros

Replicação viral

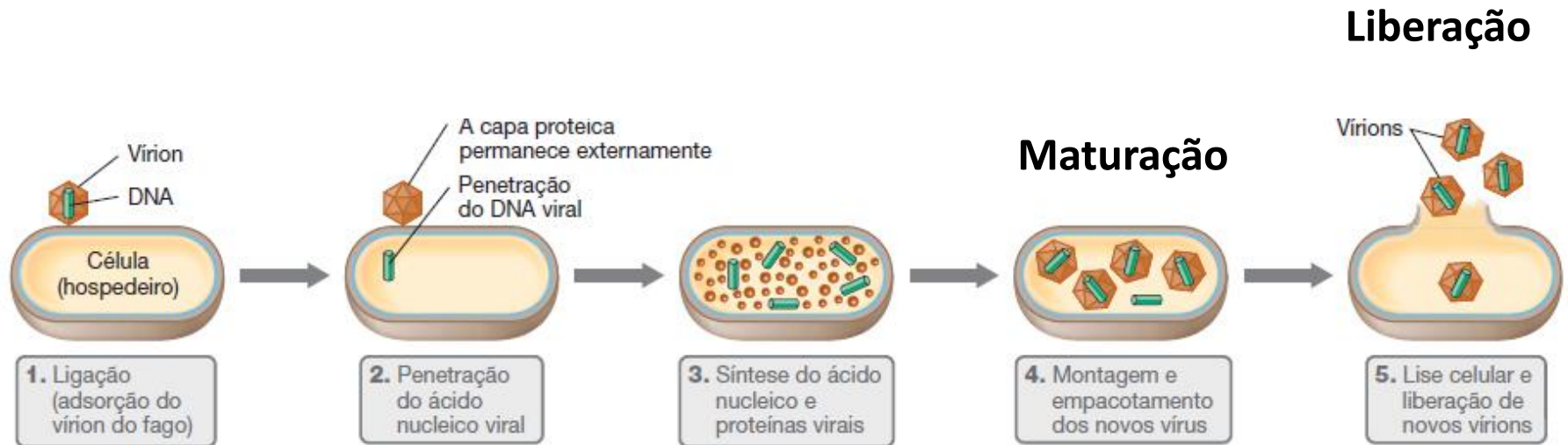


Figura 8.6 Ciclo de replicação de um vírus bacteriano. Os vírions e a célula não estão representados em escala. O tamanho da população liberada pode ser de uma centena ou mais vírions por célula.

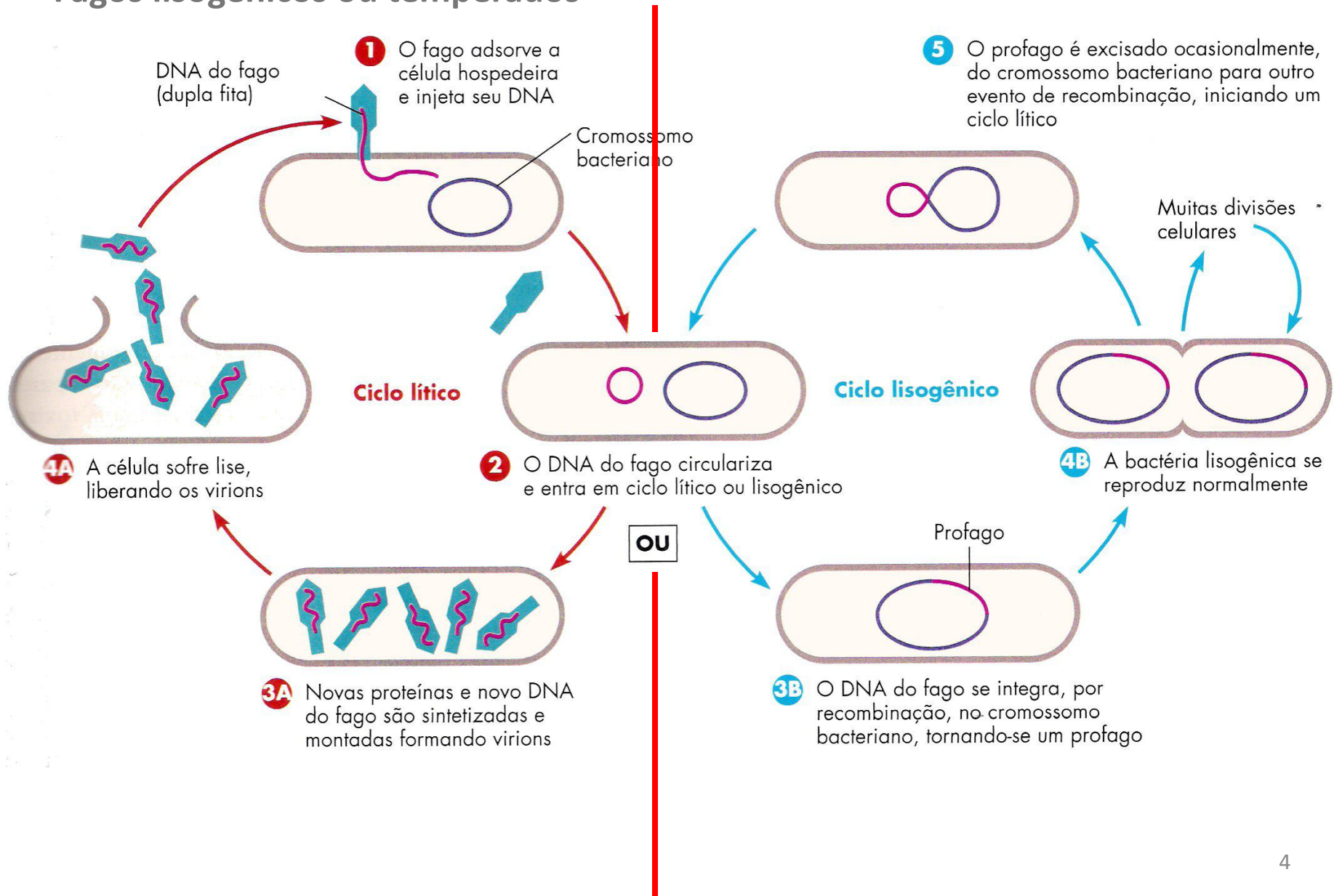
Multiplicação Viral

- Ácido nucléico viral codifica poucos genes necessários à biossíntese de novos vírus.
 - proteínas do capsídeo
 - algumas enzimas envolvidas na replicação do ácido nucléico
- Célula hospedeira geralmente “fornece”: enzimas para a síntese protéica, ribossomos, tRNA e ATP.
- Ciclo de vida viral melhor conhecido é o dos bacteriófagos.
 - **ciclo lítico** (lise e morte da célula hospedeira).
 - **ciclo lisogênico** (célula hospedeira permanece viva).



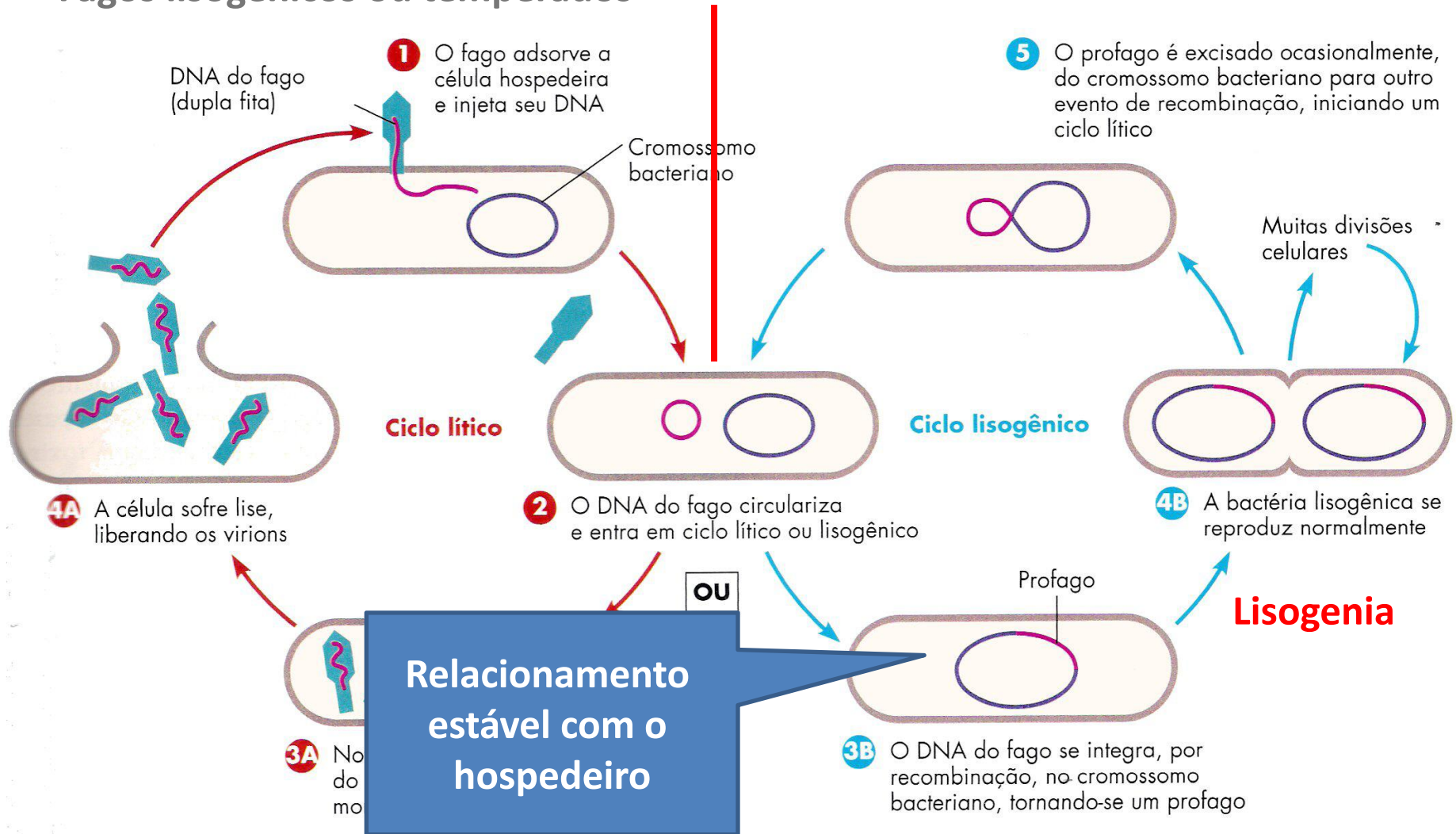
Ciclos Lítico e Lisogênico do bacteriófago λ em *E. coli*.

Fagos lisogênicos ou temperados



Ciclos Lítico e Lisogênico do bacteriófago λ em *E. coli*.

Fagos lisogênicos ou temperados



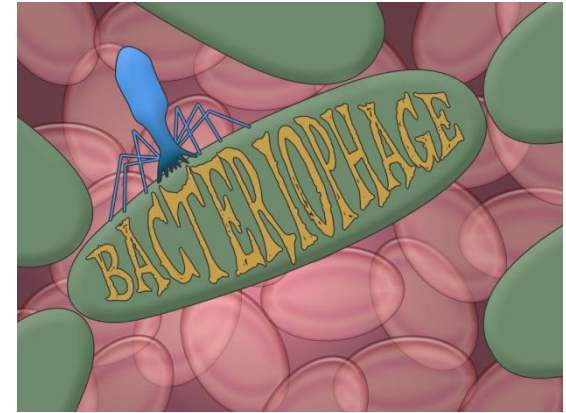
Lisogenia

- Apresenta 3 consequências para a célula hospedeira:
 1. célula lisogênicas **são imunes à reinfecção pelo mesmo fago** (mas não a outros tipos)
 2. **fago conversão**: adquirem novas propriedades. Exemplo: toxina de *Corynebacterium diphtheriae* é sintetizada a partir de um gene do profago.
 3. **transdução especializada**: transferência de determinados genes bacterianos via profago.

Vírus – Cultivo

- Vírus + células = cultivo!

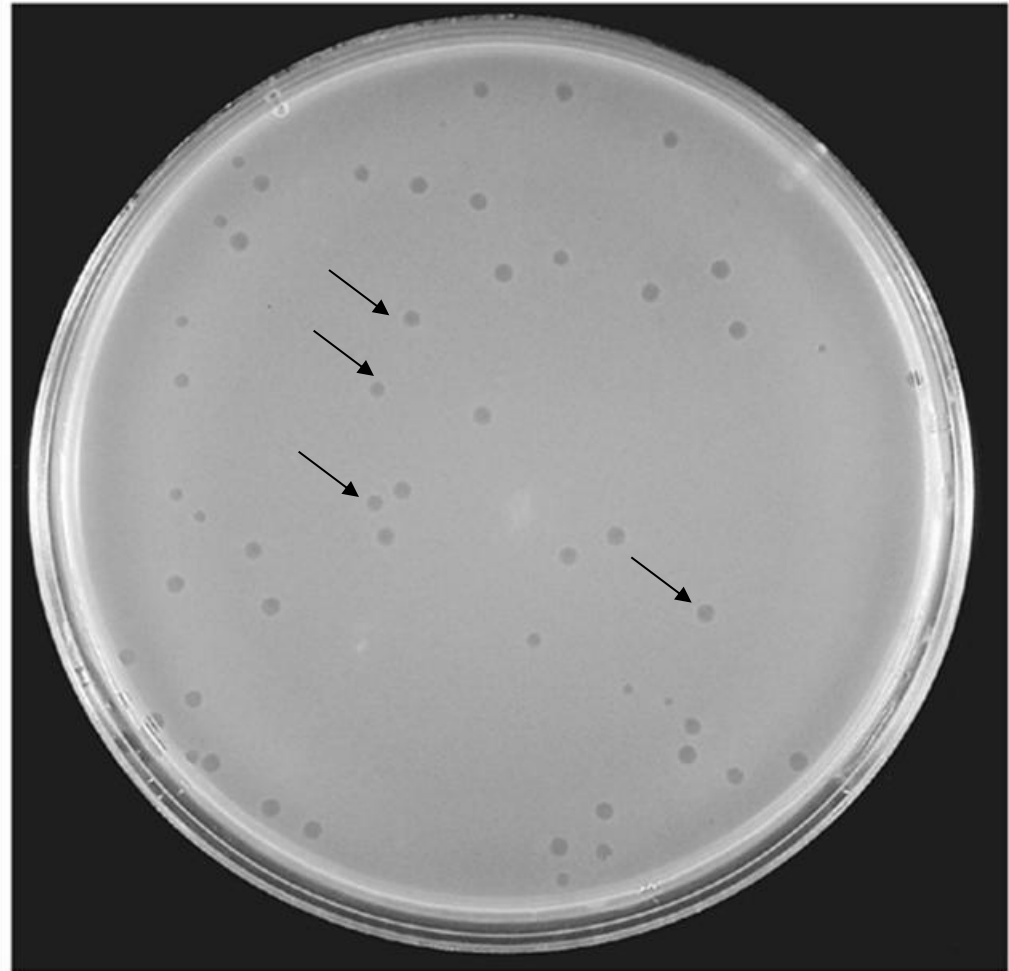
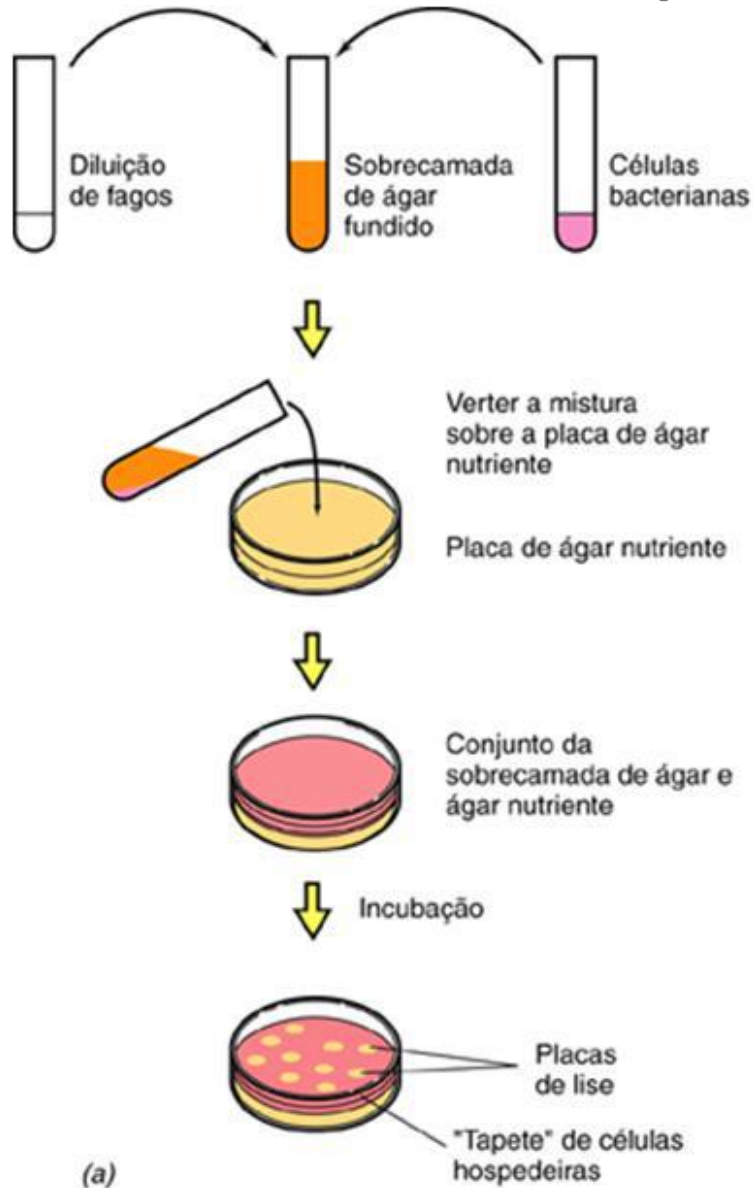
Requerem laboratórios de nível de biossegurança 2 ou 3 dependendo do vírus



- Cultivo de bacteriófagos em laboratório
 - crescem em meio líquido e sólido com células bacterianas em cultura pura
 - *método da placa de lise*: detecção e contagem de partículas virais

Vírus – Cultivo vírus bacterianos

Método de placa: detecção e contagem



Quantificação de vírus bacterianos utilizando o ensaio de formação de placas de lise pela técnica de sobrecamada de ágar.
Unidades formadoras de placas (UFP)

Vírus – Cultivo vírus bacterianos

Método de placa: detecção e contagem

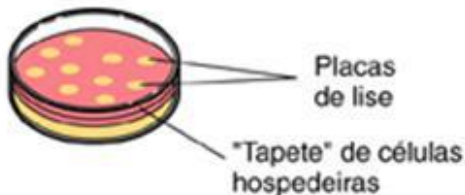


Quando um vírion inicia uma infecção → placa de lise (zona clara ou zona de lise)

Convencionou-se que cada placa de lise origina-se a partir da replicação de um único vírion

O número de *unidades formadoras de pacas de lise* corresponde ao número de unidades virais infecciosas presentes na amostra inicial em termos de *título viral*

Camada turva = células bacterianas



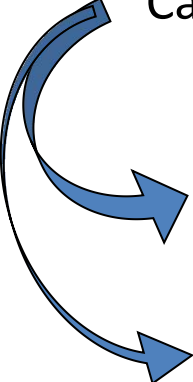
(a)

Quantificação de vírus bacterianos utilizando o ensaio de formação de placas de lise pela técnica de sobrecamada de ágar.
Unidades formadoras de placas (UFP)

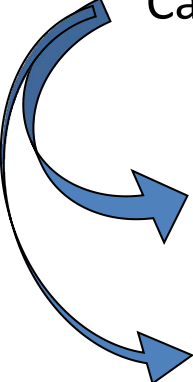
Vírus – Cultivo de vírus animais

1. Cultivo em animais experimentais

Camundongos, coelhos e cobaias



Estudos da resposta imune à infecção



Procedimento diagnóstico na identificação e isolamento

AIDS e a falta de modelos animais naturais

Chimpanzés são infectados por HIV-1 (*Lentivirus*), mas não apresentam sintomas da doença → não podem ser usados no estudo dos efeitos da multiplicação viral nem no tratamento da doença

Testes de vacinas em seres humanos

Vírus – Cultivo de vírus animais

2. Cultivo em ovos embrionados

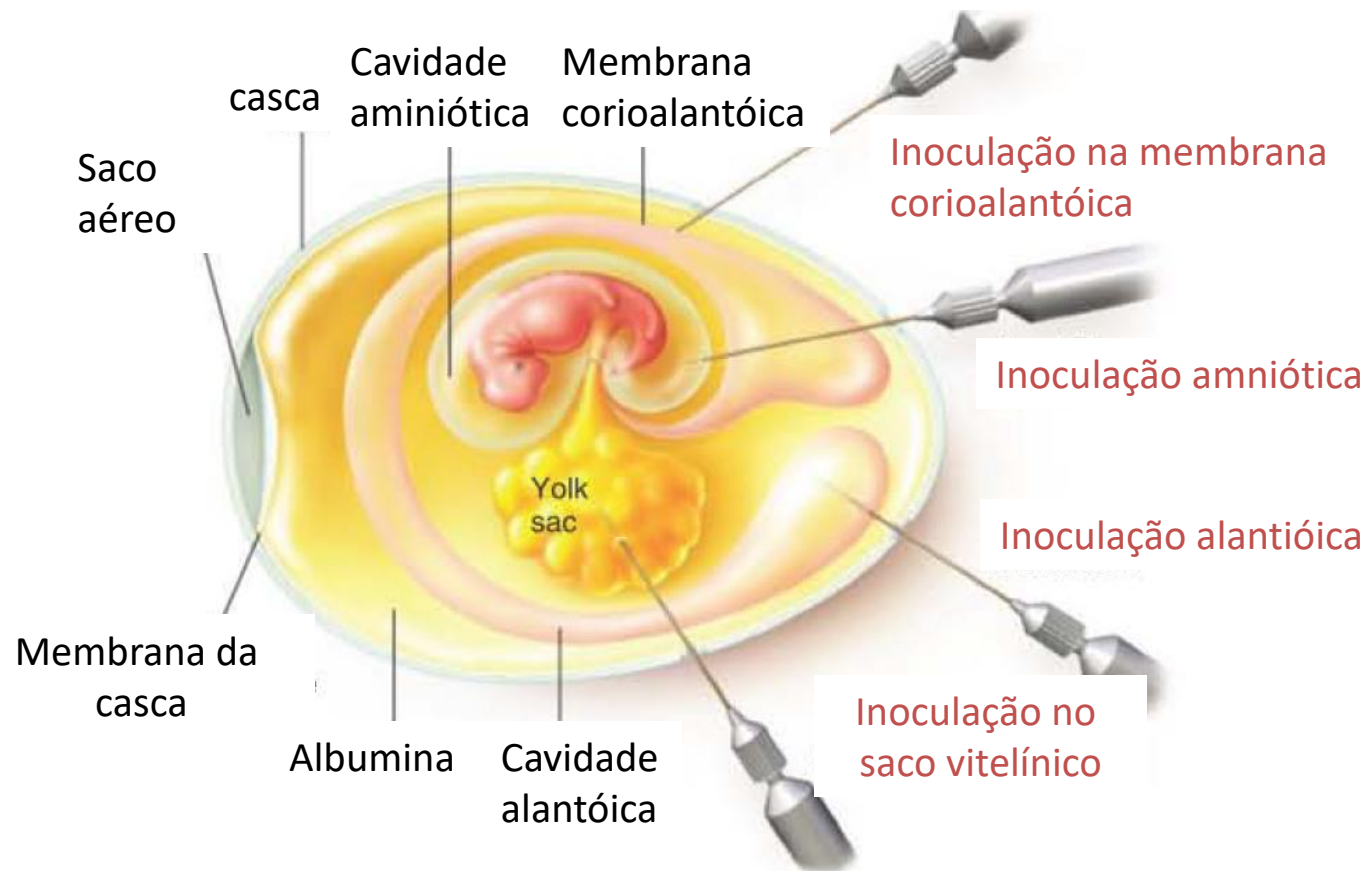


Figure 13.7 Inoculation of an embryonated egg. The injection site determines the membrane on which the viruses will grow.

Crescimento viral se manifesta pela morte do embrião

Usado na produção de vacinas (por isso a pergunta se somos alérgicos a ovo!!)

Vírus – Cultivo de vírus animais

2. Cultivo em ovos embrionados



Figure 13.7 Inoculation of an embryonated egg. The injection site determines the membrane on which the viruses will grow.

Crescimento viral se manifesta pela morte do embrião

Usado na produção de vacinas (por isso a pergunta se somos alérgicos a ovo!!)

Vírus – Cultivo de vírus animais

3. Cultivos celulares



Culturas primárias: Rim ou pulmão, dissociação de células a partir de fragmentos do órgão → períodos limitados de cultivo



Linhagens celulares permanentes: células de subcultivos das culturas primárias que crescem indefinidamente

Linhagens diplóides: são sensíveis para o isolamento de vírus - Resistem de 30 a 50 subcultivos - preparo de vacinas

Linhagens celulares estabelecidas: 70 passagens. Tecidos com **caráter neoplásico (HeLA)** ou de **células normais (Vero)**. Fins de diagnóstico, para isolamento, não utilizadas para vacinas

Temperatura ótima: 36°C a 37°C, 35°C (monocamada)

pH fisiológico: CO₂-bicarbonato, estufa de CO₂

RPMI: manutenção de algumas linhagens celulares

Vírus – Identificação

Cultura de células:

Efeito citopatológico (danos na monocamada)

Hemadsorção → Agregação de eritrócitos à superfície de células animais, em meio de cultura, após infecção por vírus.

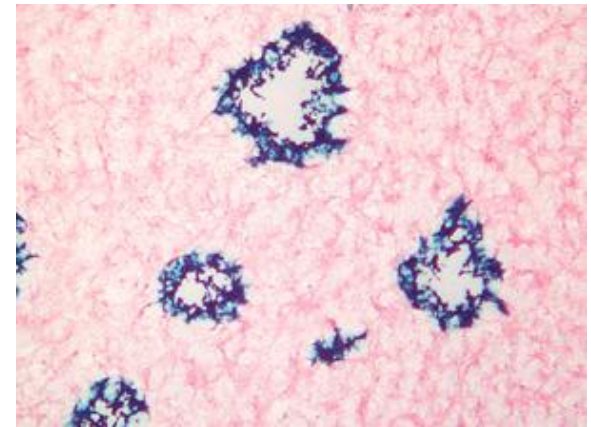
Hemaglutinação → vírus se ligam a eritrócitos formando pontes entre eles (auxílio das espículas)

Microscopia óptica: inclusões virais

colorações Hematoxilina-eosina, Papanicolau ou laranja-de-acridina

Microscopia eletrônica:

Morfologia ultra-estrutural



Células Vero infectadas por Vírus da Herpes Simplex (HSV)

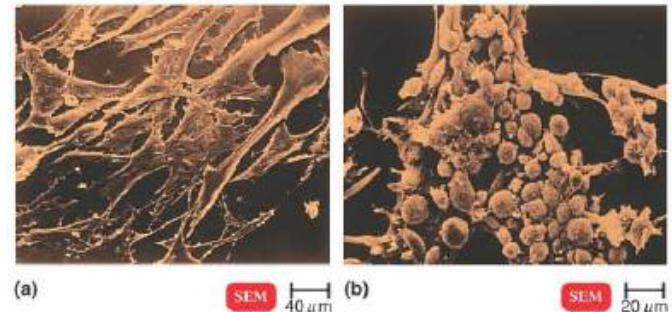
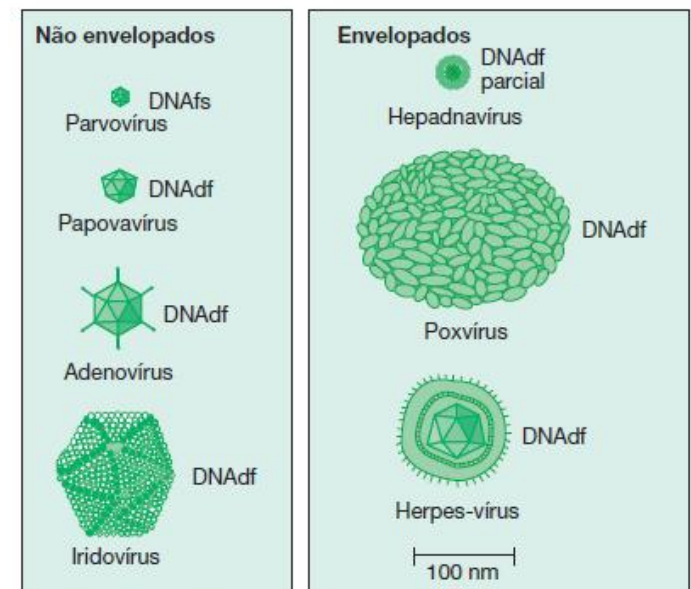


Figure 13.9 The cytopathic effect of viruses. (a) Uninfected mouse cells align next to each other, forming a monolayer. (b) The same cells 24 hours after infection with vesicular stomatitis virus (VSV) (see Figure 13.18a). Notice the cells pile up and "round up."

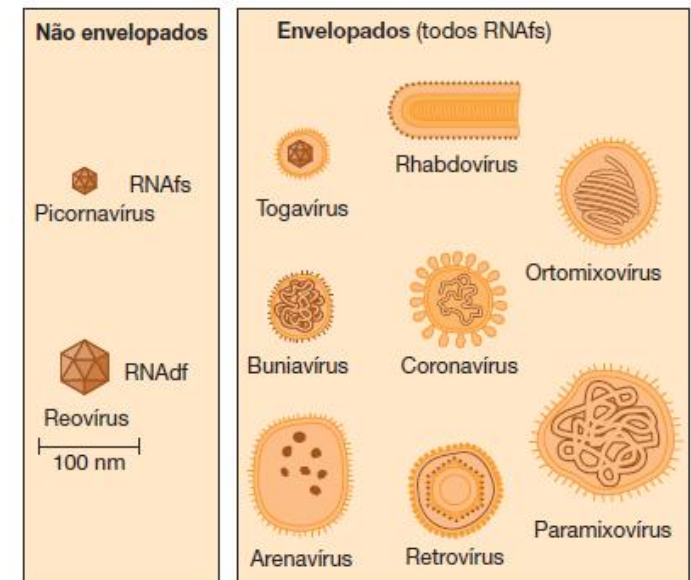
Vírus animais

Vírião completo se insere na célula

Célula eucariótica possui núcleo onde muitos vírus são replicados



(a) Vírus de DNA



(b) Vírus de RNA

Figura 8.21 Diversidade dos vírus de animais. Formas e tamanhos relativos dos principais grupos de vírus de vertebrados. O genoma do hepadnavírus apresenta uma fita de DNA completa e parte da fita complementar.

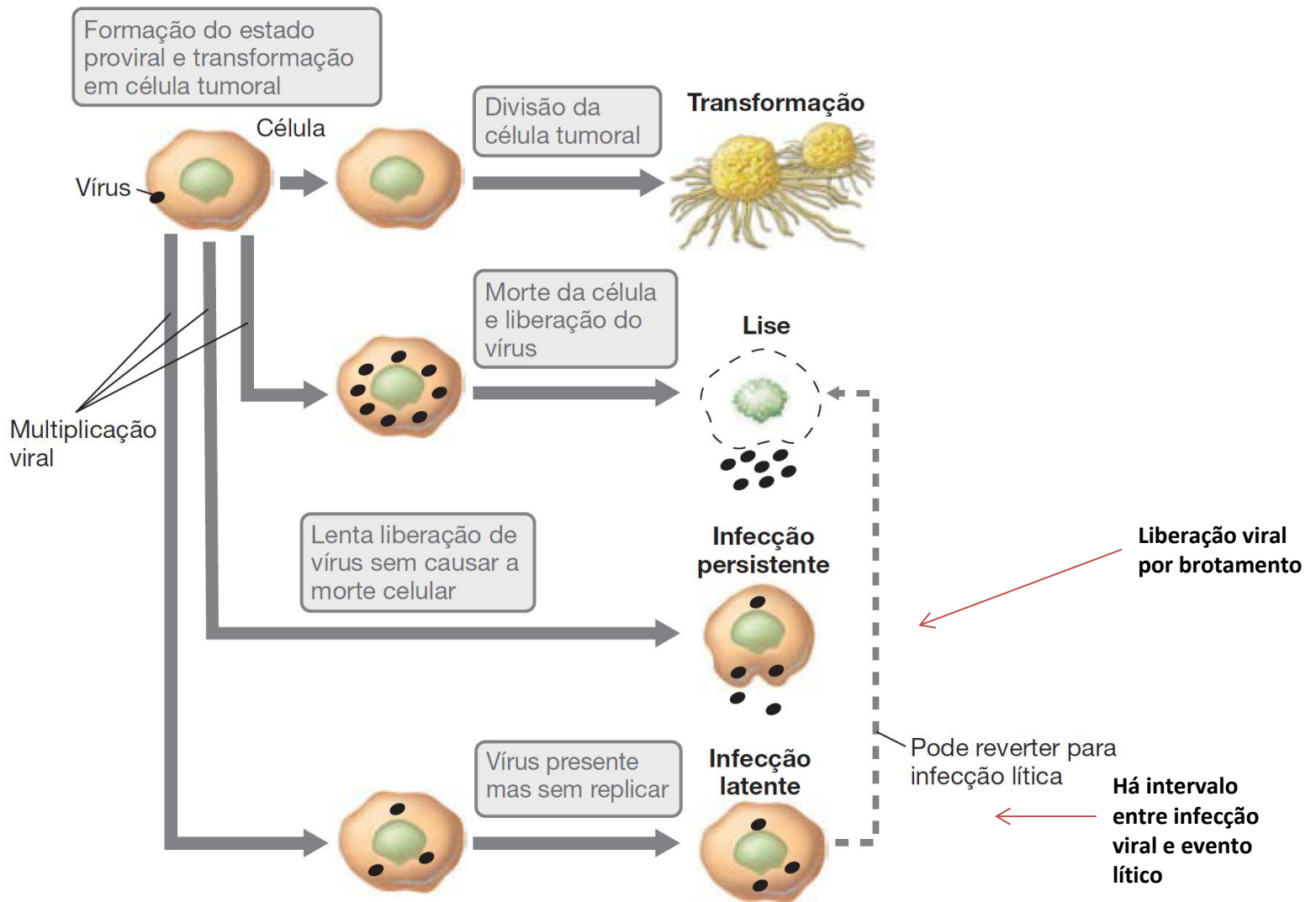


Figura 8.22 Possíveis efeitos causados por vírus de animais em células infectadas. A maioria dos vírus de animais é lítica e somente poucos são reconhecidos como cancerígenos, por causarem transformação celular.

Família Retroviridae

- Vírus de RNA
 - *Retro* = “para trás”
 - Transferem informações de maneira reversa (de RNA para DNA)
 - Muitos retrovírus infectam vertebrados
 - Gênero *Lentivirus* inclui as subespécies HIV-1 e HIV-2 que causam a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
 - Carregam sua própria polimerase que é DNA polimerase dependente de RNA (Transcriptase reversa) (RNA→DNA)
-
- *gag* → proteínas estruturais
 - *pol* → transcriptase reversa e integrase
 - *env* → proteínas do envelope

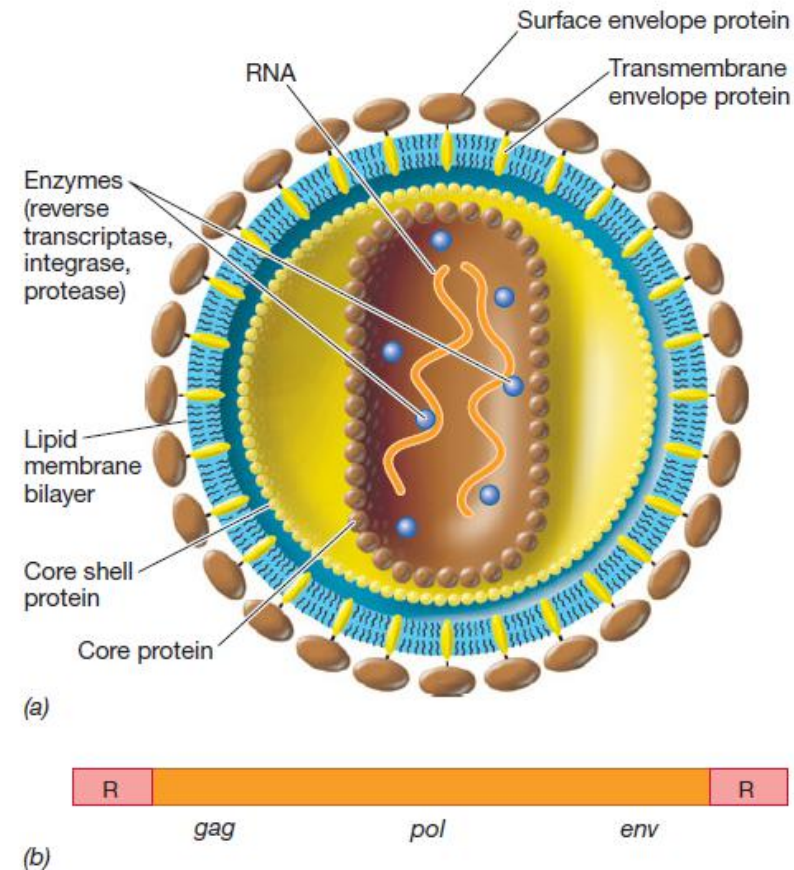
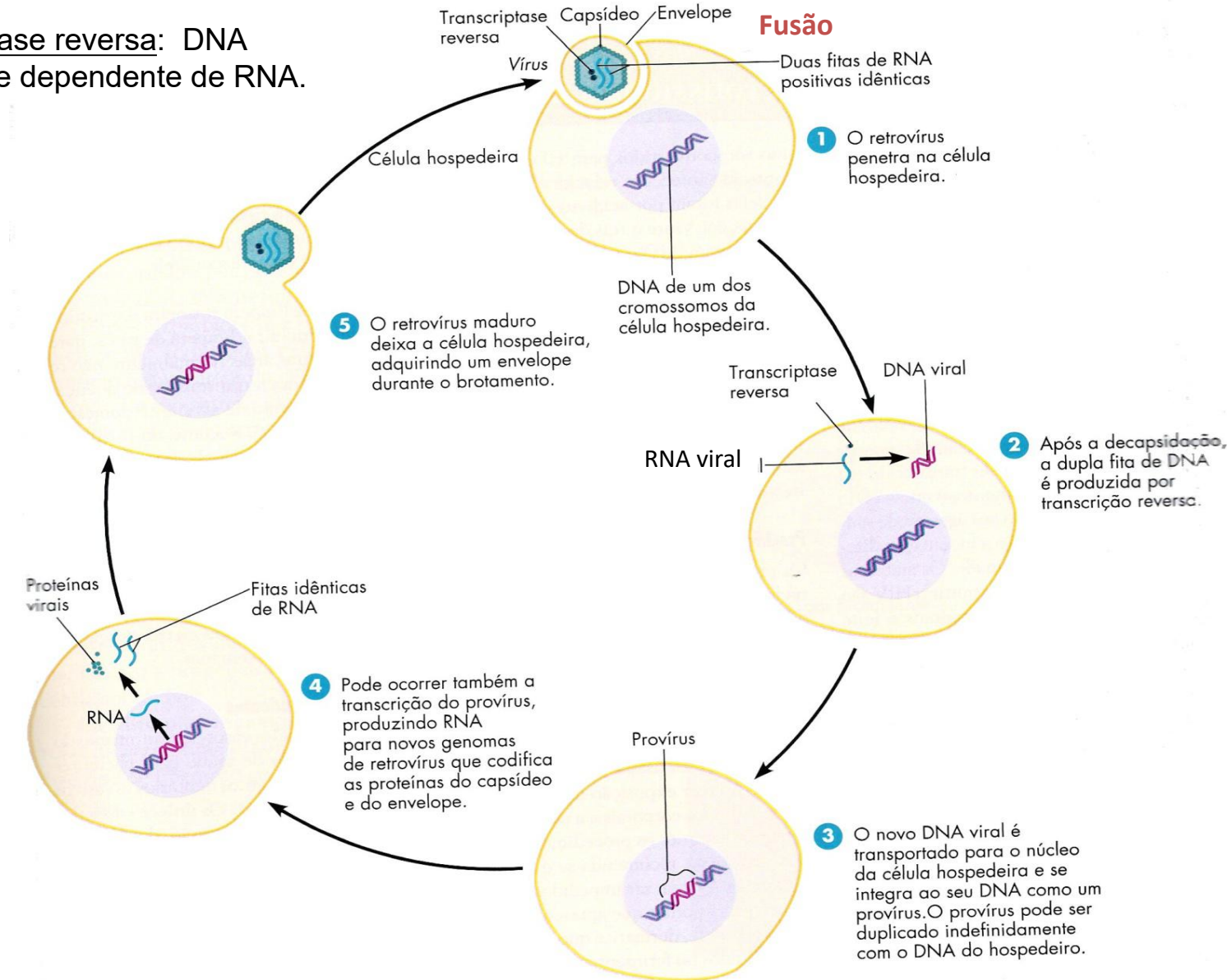


Figure 9.23 Retrovirus structure and function. (a) Structure of a retrovirus. (b) Genetic map of a typical retrovirus genome. Each end of the genomic RNA contains direct repeats (R).

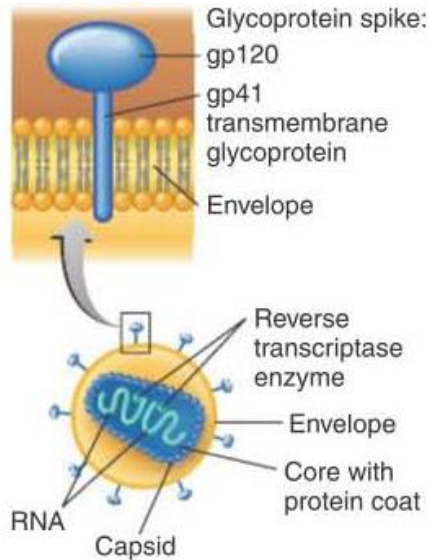
Processo de multiplicação e herança dos Retroviridae. Um retrovírus pode se tornar um provírus que se replica em estado latente, podendo também, produzir novos retrovírus.

Transcriptase reversa: DNA polimerase dependente de RNA.



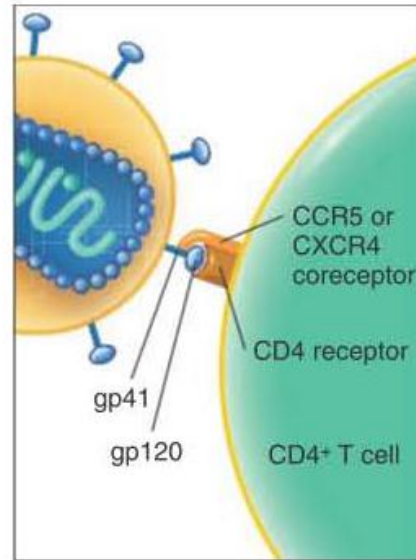
Família Retroviridae

Sítio de adsorção



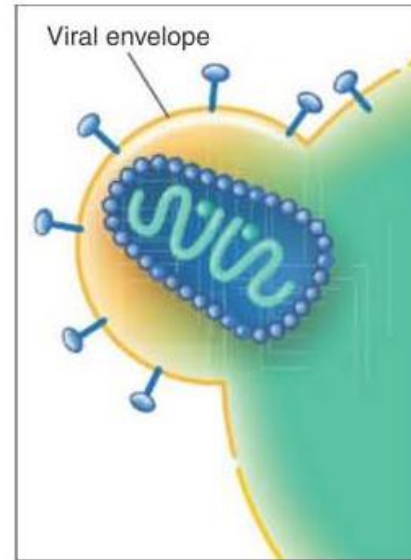
Structure of HIV and infection of a CD4⁺ T cell. The gp120 glycoprotein spike on the membrane attaches to a receptor on the CD4⁺ cell. The gp41 transmembrane glycoprotein probably facilitates fusion by attaching to a proposed fusion receptor on the CD4⁺ cell.

Adsorção



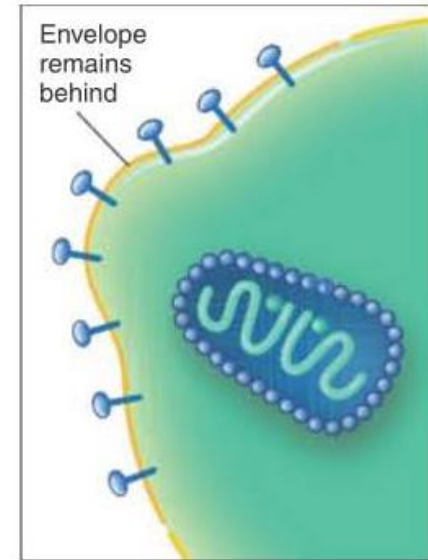
1 Attachment. The gp120 spike attaches to a receptor and to a CCR5 or CXCR4 coreceptor on the cell.

Fusão



2 Fusion. The gp41 participates in fusion of the HIV with the cell.

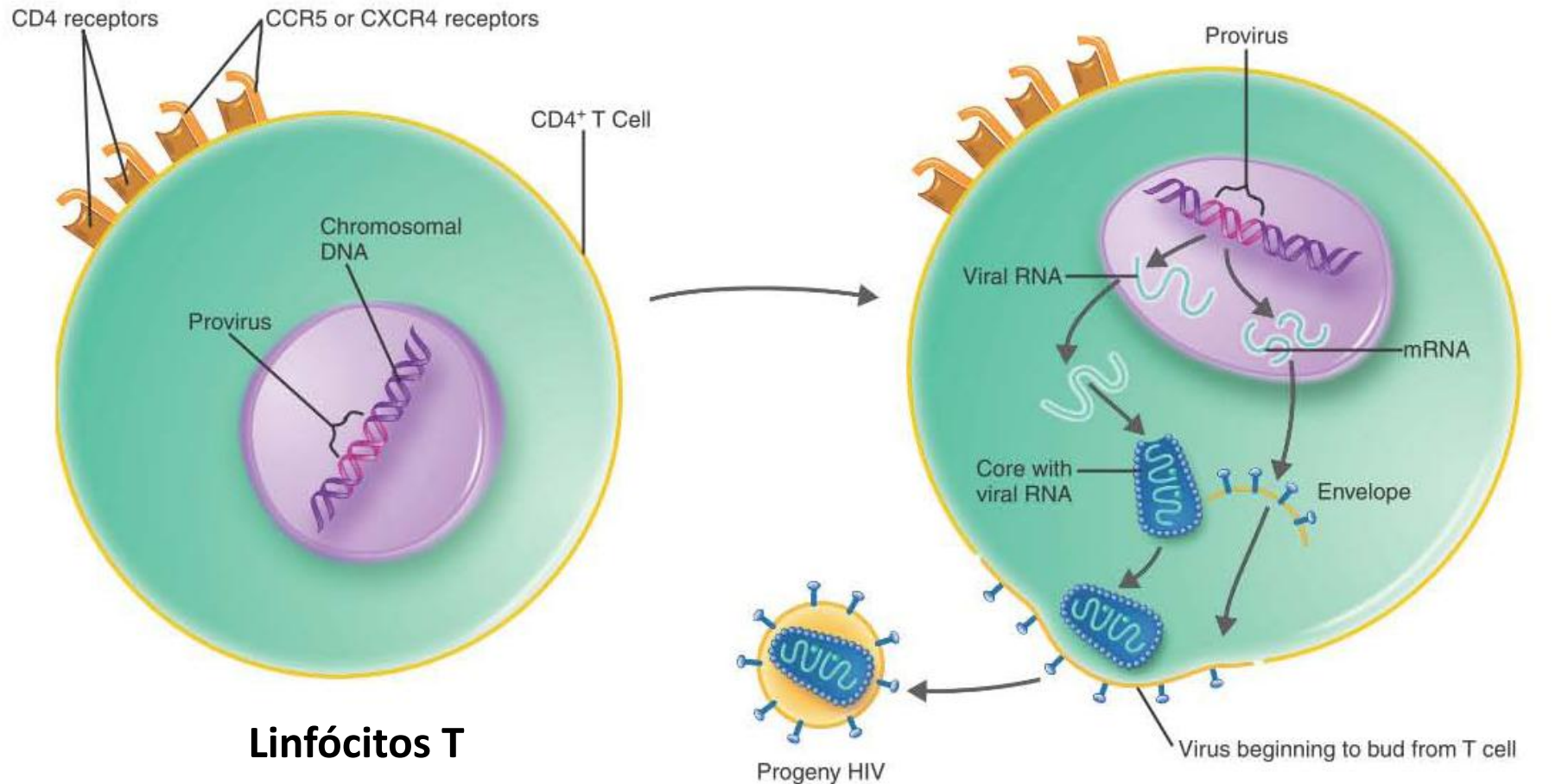
Penetração



3 Entry. Following fusion with the cell, an entry pore is created. After entry, the viral envelope remains behind and the HIV uncoats, releasing the RNA core (see Figure 19.14b) for directing synthesis of the new viruses.

Figure 19.13 HIV structure and attachment to receptors on target T cell.

Família Retroviridae



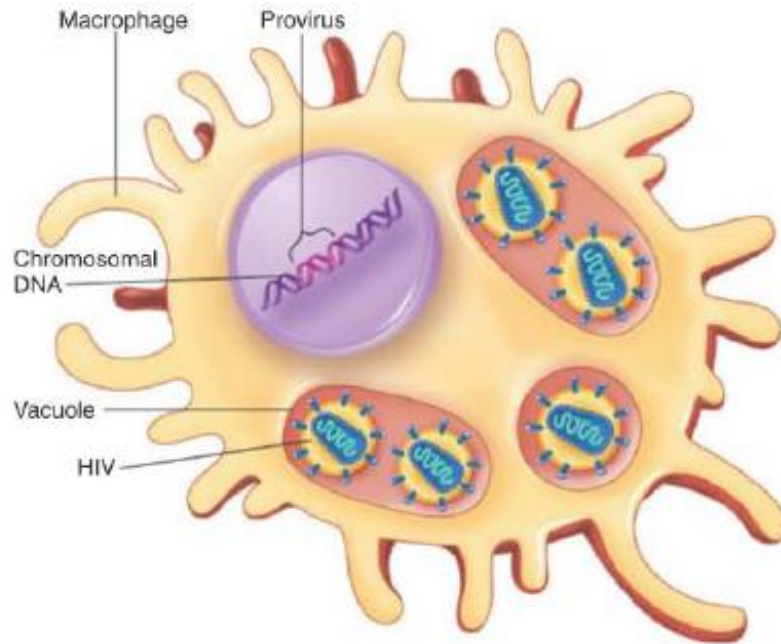
(a) Latent infection. Viral DNA is integrated into cellular DNA and forms a provirus (see page 389) that can later be activated to produce infective viruses.

(b) Active infection. The provirus is activated, allowing it to control the synthesis of new viruses, which bud from the host cell. Final assembly takes place at the cell membrane, taking up the viral envelope proteins as the virus buds from the cell.

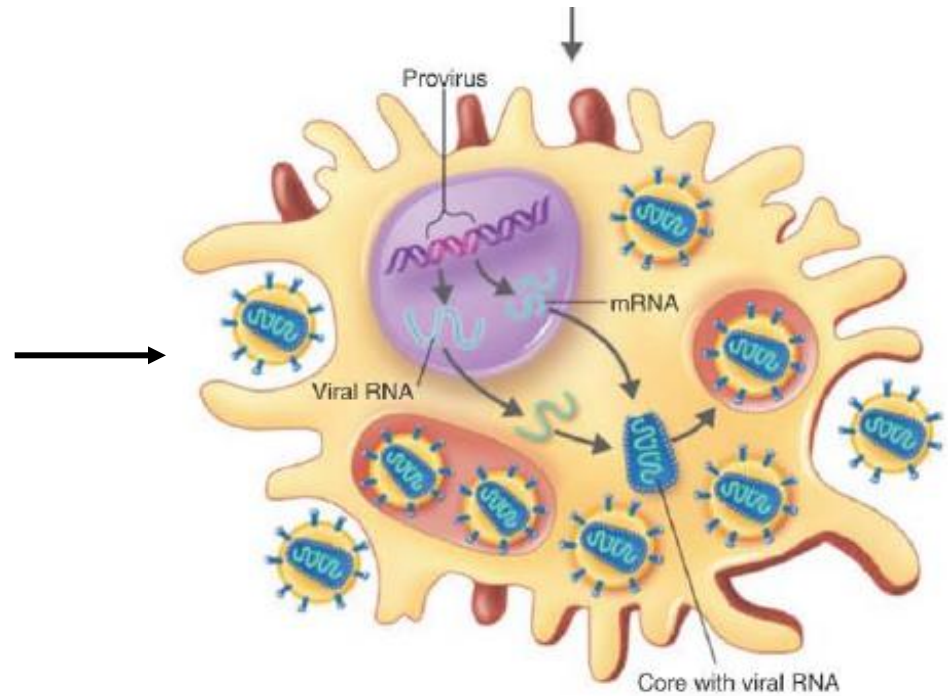
Figure 19.14 Latent and active HIV infection in CD4⁺ T cells.

Família Retroviridae

Macrófago



(a) Latently infected macrophage. HIV can persist either as a provirus or as a complete virion in vacuoles.



(b) Activated macrophage. New viruses are produced from provirus. Completed virions are either released or persist in the macrophage within vacuoles.

Figure 19.15 Latent and active HIV infection in macrophages.

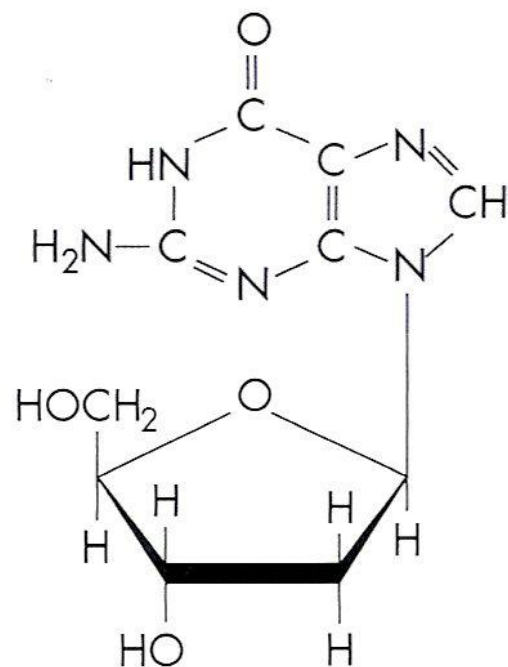
Principais vacinas para doenças virais

Doença	Vacina	Indicação
Gripe	Vírus inativado	Pessoas saudáveis com mais de 65 anos; pessoas com doenças respiratórias crônicas
Sarampo	Vírus atenuado	Lactentes com 15 meses de idade
Caxumba	Vírus atenuado	Lactentes com 15 meses de idade
Rubéola	Vírus atenuado	Lactentes com 15 meses de idade; mulheres em idade fértil que não estejam grávidas
Varicela	Vírus atenuado	Lactentes com 12 meses de idade
Poliomielite	Vírus inativado (Salk) ou atenuado (Sabin)	Crianças; adultos, qd risco justifica
Raiva	Vírus inativado	Profissionais em contato com vida selvagem em áreas endêmicas ou mordidas por animais; veterinários
Hepatite B	Fragmentos antigênicos do vírus	Crianças; adultos (profissionais da saúde, usuários de drogas injetáveis, pessoas com múltiplos parceiros sexuais, familiares em contato com portador)
Hepatite A	Vírus inativado	Pessoas em viagem para áreas endêmicas e durante surtos
Varíola	Vírus da vaccínia vivo	Certas pessoas ligadas ao serviço de saúde ou militar

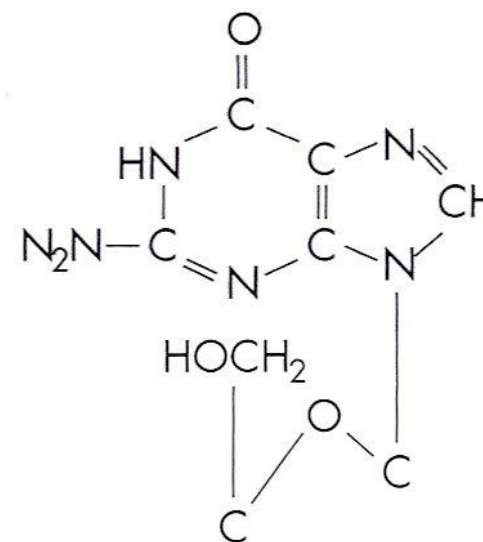
Drogas antivirais

Droga Antiviral		Modo de ação	Comentários
Análogos de nucleosídeos e nucleotídeos			
Aciclovir , ganciclovir, ribavirina, lamivudina		Inibem a síntese de DNA ou RNA	Usados principalmente contra herpesvírus
Cidofovir		Inibe a síntese de DNA ou RNA	Possivelmente eficaz contra a varíola
Zidovudina (AZT) , didanosina, zalcitabina, tenofovir		Antiretrovirais que bloqueiam a síntese de DNA pela transcriptase reversa	Usado para quimioterapia contra HIV
Outros inibidores enzimáticos			
Indinavir, saquinavir		Inibe a protease viral	Usado para quimioterapia contra HIV
Fixação e decapsidação			
Zanamivir, fosfato de oseltamivir		Inibem a neuraminidase no vírus da gripe	Tratamento da gripe
Amantadina, zimantadina		Inibem a decapsidação	Tratamento da gripe
Interferons			
α -interferon		Inibe a disseminação do vírus para novas células	Hepatite viral 23

Guanina



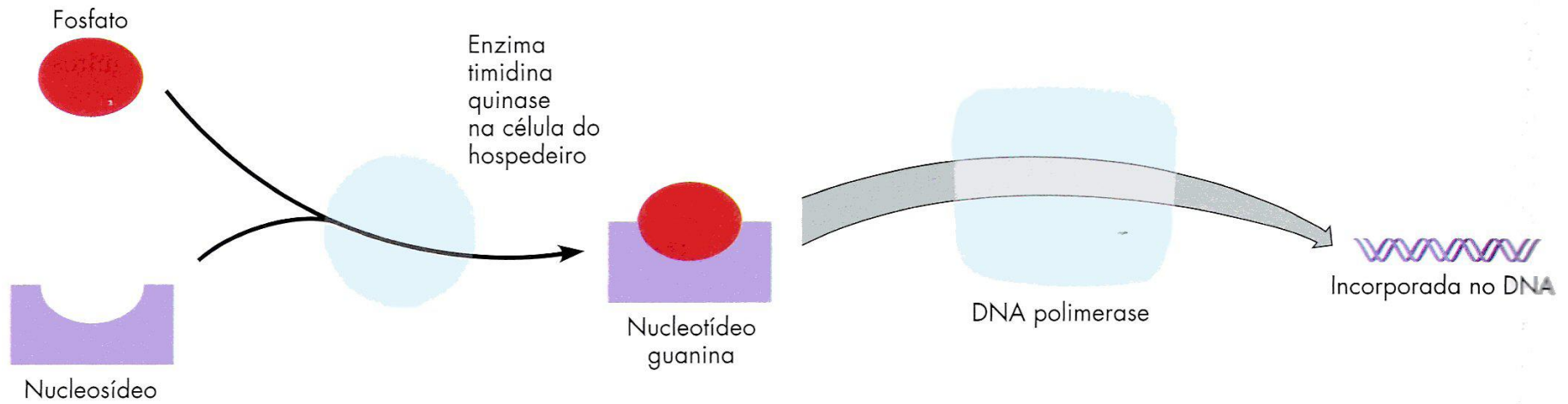
Deoxiguanina



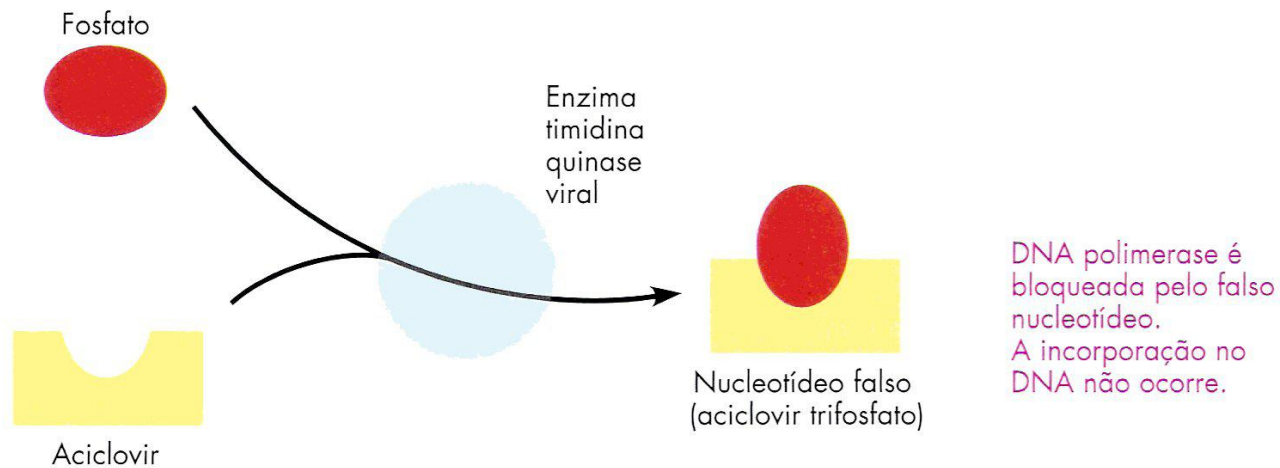
Aciclovir

(a) Semelhança estrutural entre aciclovir e o nucleosídeo contendo guanina

Estrutura da droga anti-viral Aciclovir.



(b) Síntese do nucleotídeo guanina do DNA viral normal



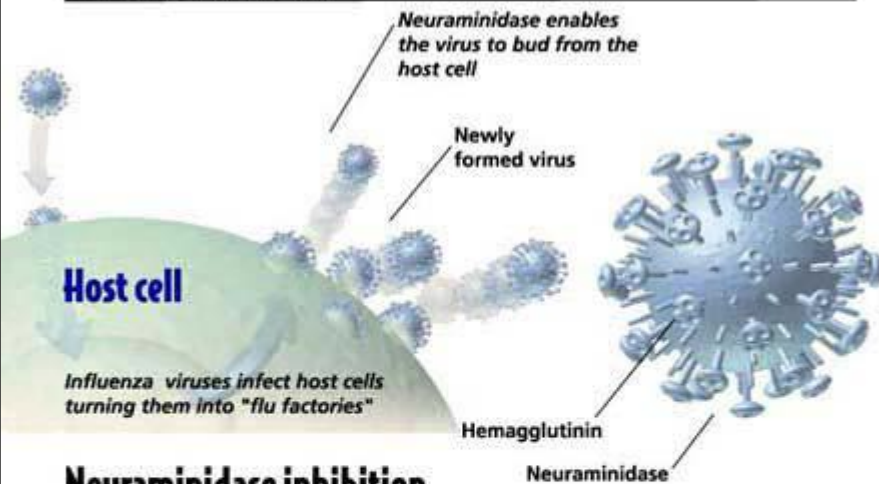
(c) A síntese do falso nucleotídeo do DNA viral na presença de aciclovir

Mecanismo de ação da droga anti-viral Aciclovir.

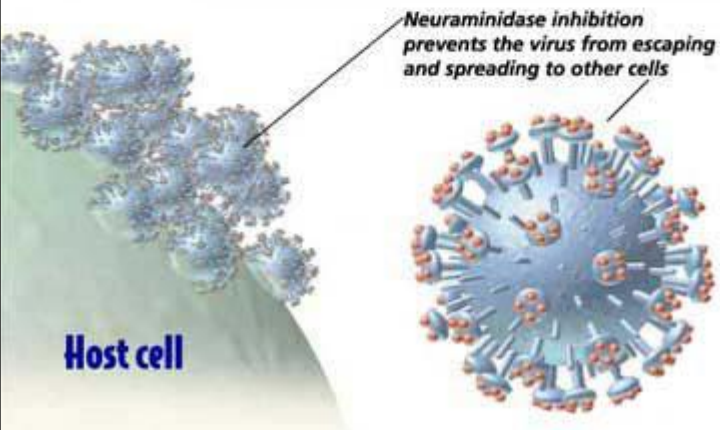
Neuraminidase auxiliam a liberação dos vírus de dentro das células animais por clivar as ligações glicosídicas de glicoproteínas e glicolipídios de células animais

The concept of neuraminidase inhibition

Influenza infection



Neuraminidase inhibition



Entidades subvirais

Príons

- **Forma extracelular distinta de natureza totalmente proteica**
- **Não contém DNA ou RNA**

- 1982: neurobiologista Stanley Prusiner – sugeriu que proteínas infecciosas eram a causa do *scrapie* (doença neurológica de ovelhas).
- 1997 – Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina
- Causam doenças neurológicas animais do tipo **encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs)**.
 - bovinos: “doença da vaca louca” (BSE)
 - Humanas: doença de Creutzfeldt-Jakob variante (CJDv)
- Podem ser transmitidos por meio de carne/tecido contaminado ou por ração feita a partir de animais contaminados.

Entidades subvirais

Príons

- **Forma extracelular distinta de natureza totalmente proteica**
- **Não contém DNA ou RNA**

- 1982: neurobiologista Stanley Prusiner – sugeriu que proteínas infecciosas eram a causa do *scrapie* (doença neurológica de ovelhas).
- 1997 – Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina
- Causam doenças neurológicas animais do tipo tra



3SE)

akob van

arne/tec



Entidades subvirais

Príons

- **Forma extracelular distinta de natureza totalmente proteica**
- **Não contém DNA ou RNA**

- 1982: neurobiologista Stanley Prusiner – sugeriu que proteínas infecciosas eram a causa do *scrapie* (doença neurológica de ovelhas).
- 1997 – Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina
- Causam doenças neurológicas animais do tipo **encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs)**.
 - bovinos: “doença da vaca louca” (BSE)
 - Humanas: doença de Creutzfeldt-Jakob variante (CJDv)
- Podem ser transmitidos por meio de carne/tecido contaminado ou por ração feita a partir de animais contaminados.

Entidades subvirais

Príons

- Forma extracelular
- Não contém DNA

- 1982: neurobiologista
a causa do *scrapie* (doença)

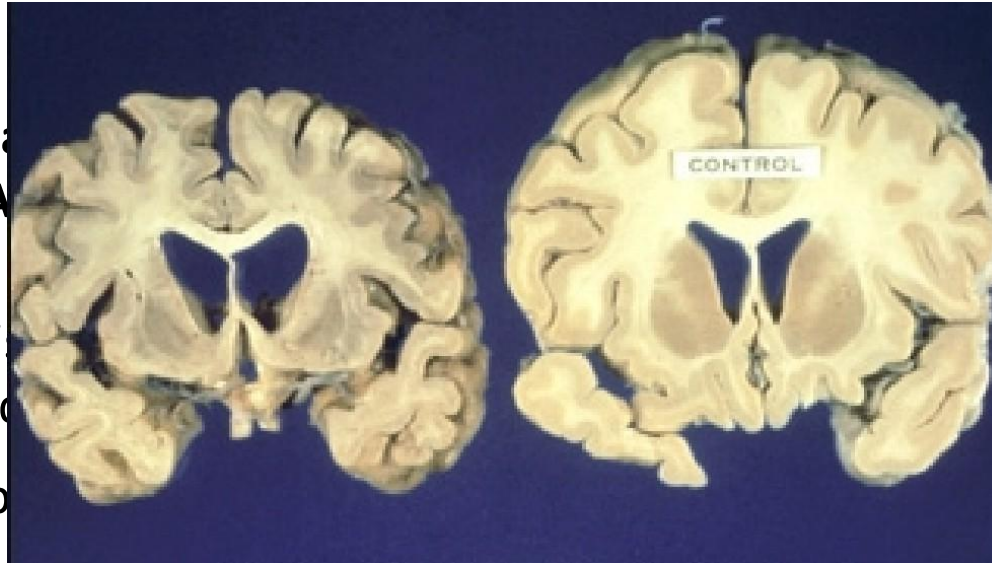
- 1997 – Prêmio Nobel

- Causam doenças neurodegenerativas
transmissíveis (TSEs)

- bovinos: “doença da vaca louca”

- Humanas: doença de Creutzfeldt-Jakob

- Podem ser transmitidos
feita a partir de animais

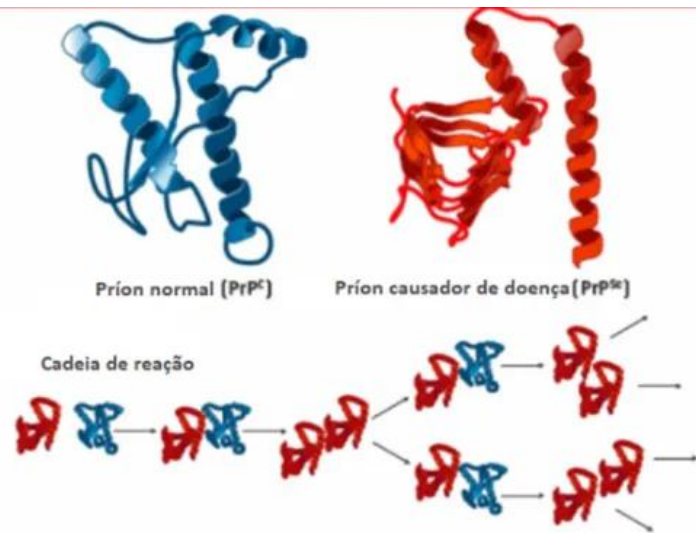


fecciosas eram

ongiformes

ou por ração

Prions



Como uma proteína pode ser infecciosa.

PrP^{C} – proteína priônica celular (normal).

PrP^{Sc} forma infecciosa da proteína priônica celular (anormal).

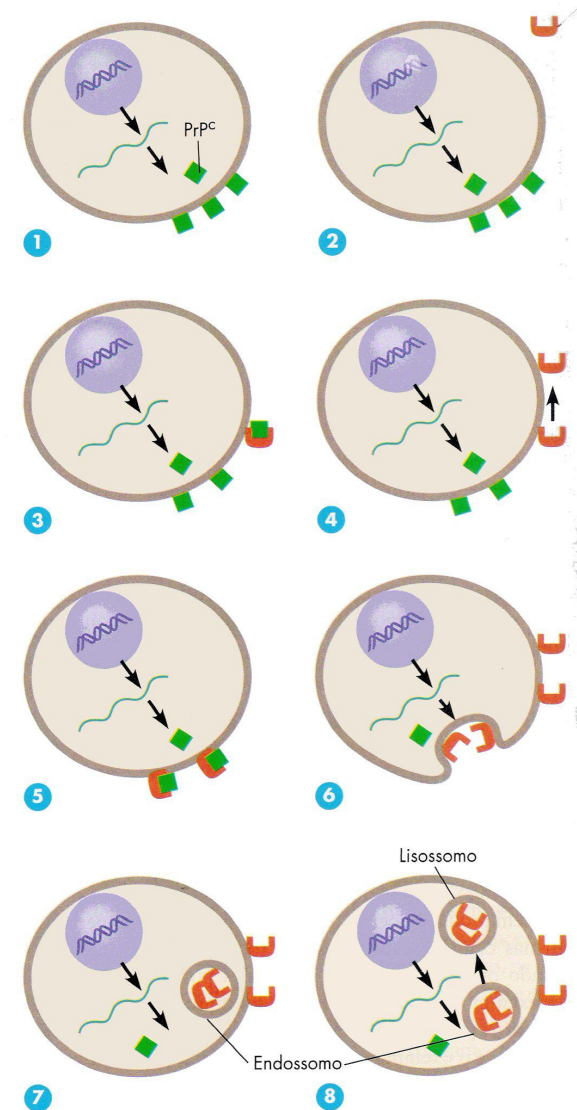
PrP^{Sc} induz a conformação incorreta das PrP^{C} e as acumula na célula.

• **1 e 2:** gene para PrP^{C} está no cromossomo 20. A PrP^{C} é produzida e secretada para a superfície celular.

• Principalmente neurônios

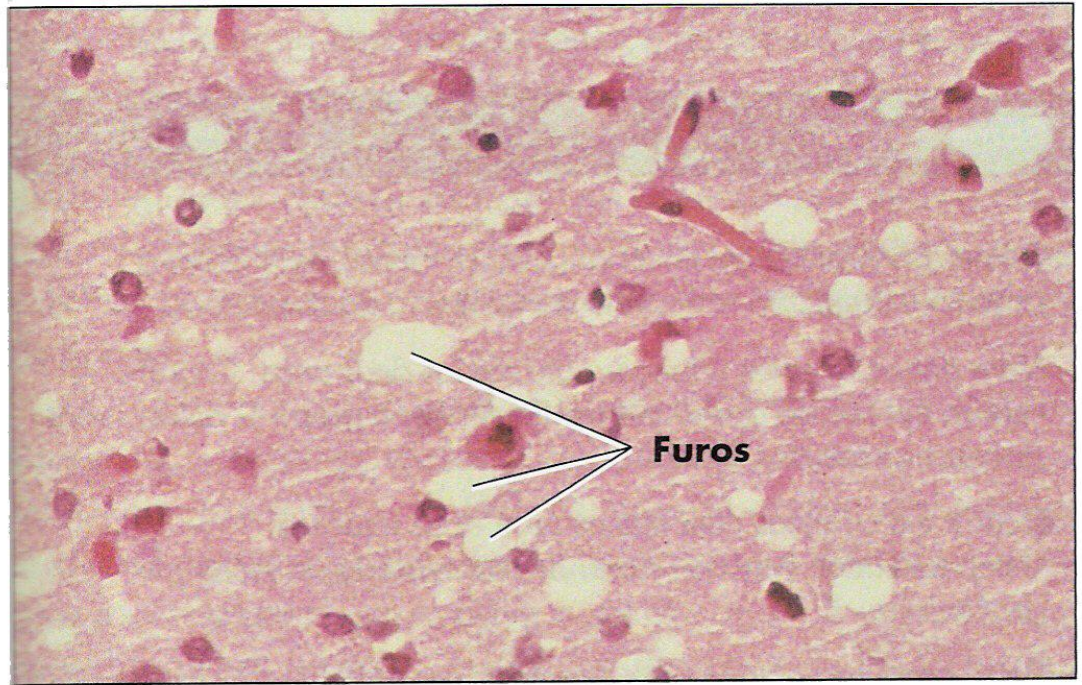
• **3 a 5:** a PrP^{Sc} reage com a PrP^{C} na superfície, convertendo-se em PrP^{Sc} .

• **6 a 8:** a PrP^{Sc} é absorvida por endocitose e seus agregados se acumulam nos lisossomos.



Prions

**Há destruição do tecido
Porém não se sabe ao
certo se esta se deve ao
acúmulo dos príons nas
células!!**



(a) Tecido cerebral mostrando lesões espongiformes

MO | 25 μm

Mecanismos pelos quais podem ser observados a doença:

- 1) Doença priônica infecciosa** – transmissão da proteína priônica entre humanos e animais;
- 2) Doença priônica esporádica** – dobramento incorreto aleatório em indivíduo normal e não infectado (atinge 1 indivíduo em 1 milhão);
- 3) Doença priônica herdada** – mutação no gene que codifica o príon

Detecção - diagnóstico

Molecular: Detectar a presença do material genético

Imunológico: Detectar a proteína do vírus
Detectar a presença de anticórpors anti-vírus

Diagnóstico

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Detectando antígeno
ou
Anticorpo
no soro do paciente

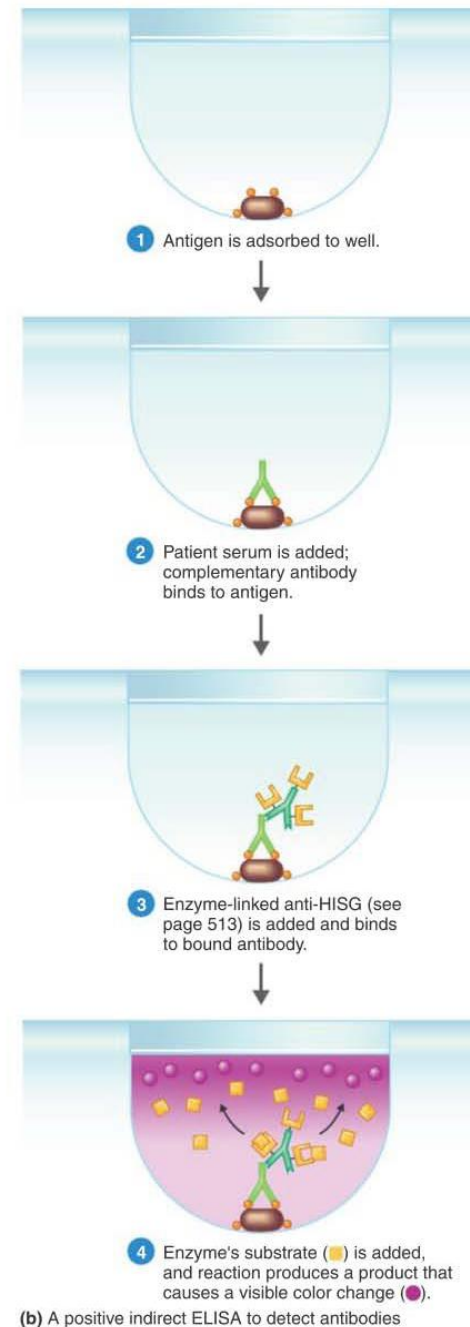
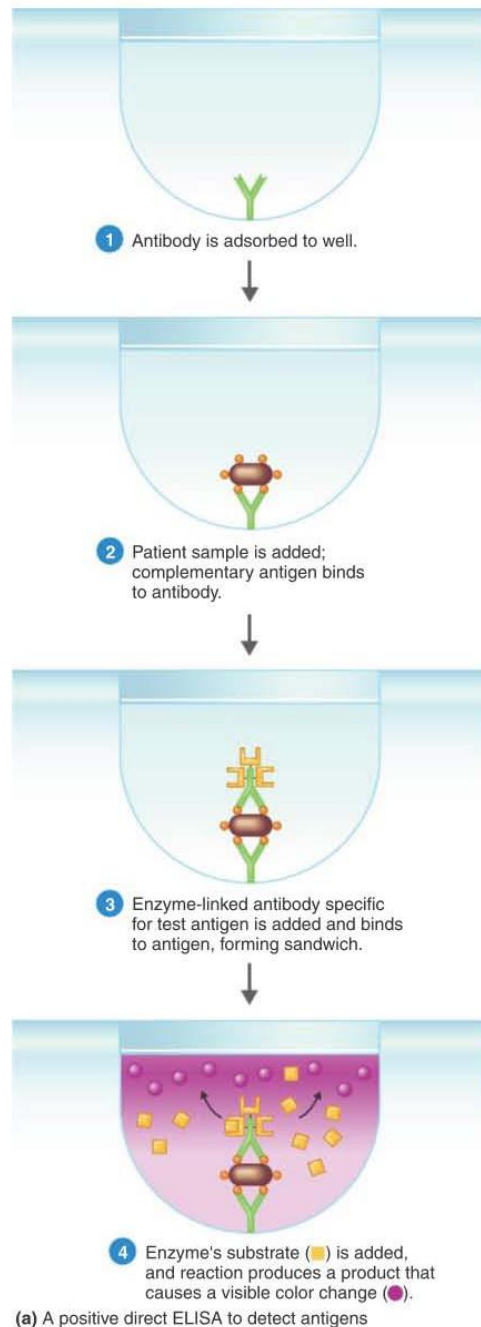


Figure 18.14 The ELISA method. The components are usually contained in small wells of a microtiter plate. An illustration of a technician carrying out an ELISA test on such a microtiter plate and the use of a computer to the results, see Figure 10.11 on page 288.

Diagnóstico imunológico

a) Principais técnicas sorológicas (ELISA) utilizadas para a detecção dos marcadores imunológicos das hepatites por vírus

A - Tipo "SANDUICHE"						Exemplo									
	+		+		+		AgHBs								
	+		+		+		Anti-HBs Anti-HDV Anti-HCV								
	+		+		+										
B - Tipo COMPETIÇÃO															
	+		+				Anti-HBc (total)								
	+		+				AgHBe								
	+		+				Anti-HBe								
C - Tipo IMUNOCAPTURE															
	+		+		+		Anti-HBc-IgM								
	+		+		+		Anti-HAV-IgM								
	soro			fase sólida			Ac IgG		Ac IgM		Ag		enzima		sistema de revelação

Diagnóstico Molecular

b) Comparação entre as três técnicas de Biologia Molecular mais utilizadas para o estudo das hepatites por vírus

