

## **BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia**

**Prof. Armando Ventura**

### **Apostila de Virologia**

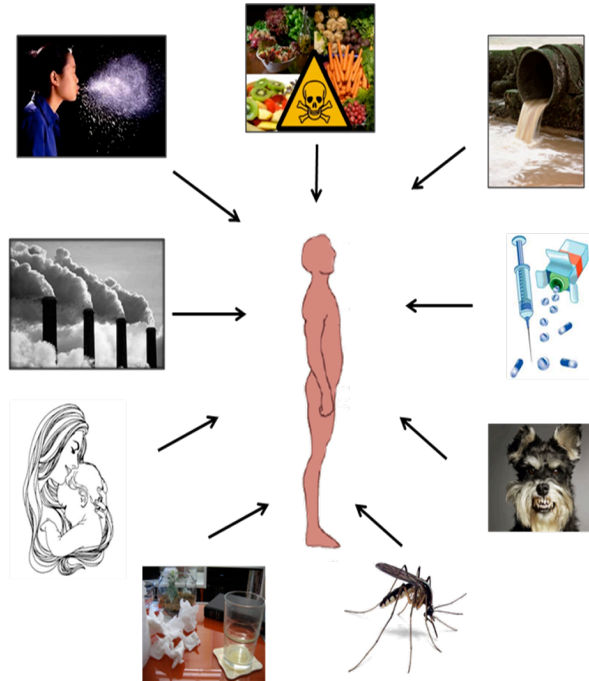
#### **Replicação viral**

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** ou **abortiva**.

- Infecção produtiva: produção de progênie viral viável.
- Infecção 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.

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 1**). 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 2**).

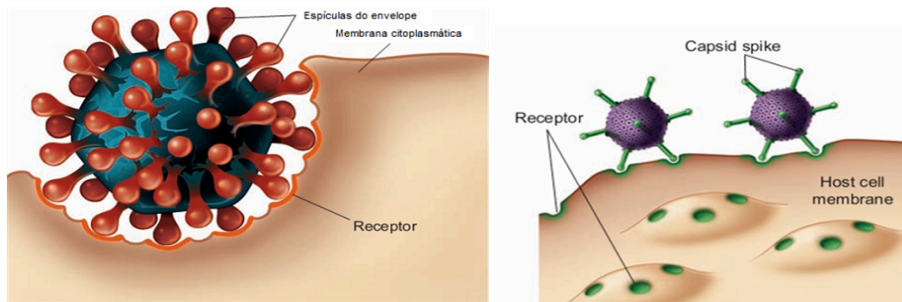


**Fig 1. Portas de entrada.**

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.

## REPLICAÇÃO VIRAL

### Adsorção/ligação



Interação entre o anti-receptor viral e o receptor celular.

**Especificidade**

**Tropismo**

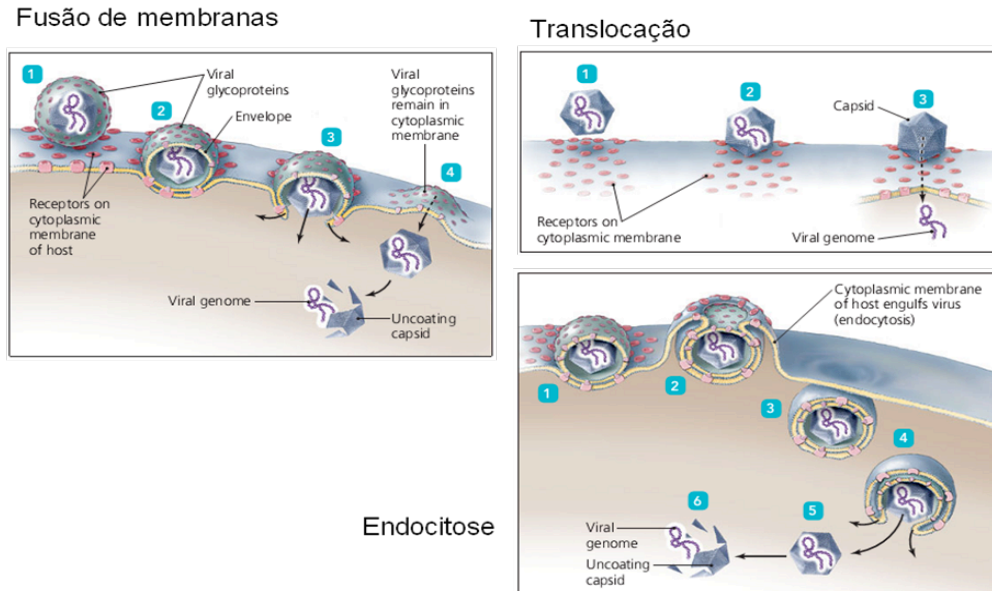
**Fig 2. Ligação do vírion a receptores específicos da célula hospedeira**

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 infectada por um vírus). Outro conceito relacionado ao reconhecimento dos receptores, e utilizado com frequência, é o **tropismo** (predileção por células de alguns tecidos).

## REPLICAÇÃO VIRAL

### Penetração



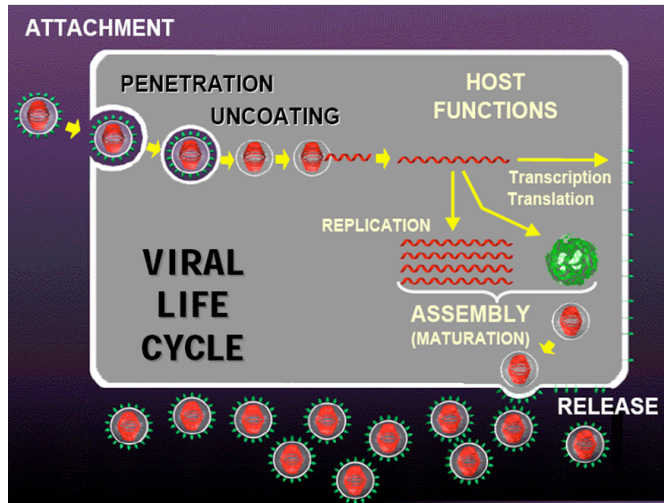
**Fig3. Mecanismos de penetração na célula hospedeira**

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** (**Fig3**).

A seguir haverá um processo de liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, ou **desnudamento**, sendo que no caso da endocitose o capsídeo sairá da vesícula endossomal por fusão com o envelope viral ou rompimento por ativação das proteínas da superfície viral desse capsídeo (**Fig 3**). Estando o capsídeo liberado no citoplasma, há uma série de mecanismos que podem ser adotados para ativar o genoma viral. O tipo de mecanismo vai depender da natureza do ácido nucléico que compõe o genoma e da família a que pertence o vírus. Há várias alternativas para a etapa de **desnudamento**. Pode haver uma **desintegração** do capsídeo com a liberação do ácido nucléico viral no citoplasma, processo em que alguma proteína viral estará garantindo a estabilidade desse ácido nucléico, como no caso dos enterovírus (ex.: hepatite A, poliomielite, com genoma de RNA simples fita positivo). Outra alternativa é o **transporte para o núcleo**, em que o capsídeo é levado para junto da membrana nuclear através de interação com elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos. A liberação do genoma viral se dá então nos poros nucleares, como é característico para os adenovírus (DNA dupla fita). Após o processo de fusão, o nucleocapsídeo helicoidal, como no caso dos vírus com genoma RNA simples fita negativo, pode ser liberado diretamente no citoplasma e iniciar o processo de transcrição dos genes virais. Finalmente, há vírus em que o

capsídeo desintegra apenas parcialmente, permitindo a passagem de mRNA e metabólitos, como é o caso dos rotavírus (um Reovírus, com genoma de RNA dupla fita).

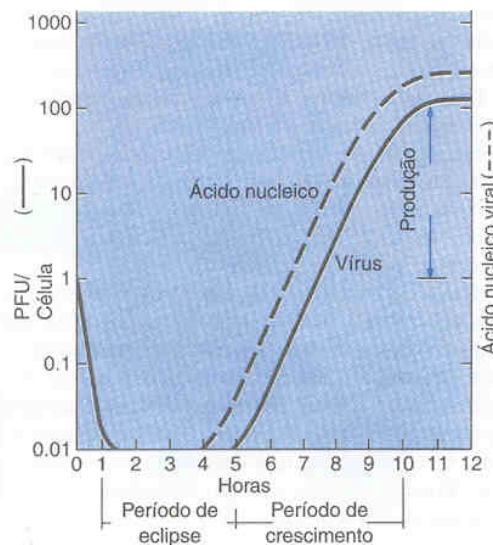
À **Figura 4** temos um esquema das etapas da replicação viral.



**Fig. 4.**

### Replicação do genoma e síntese das proteínas virais

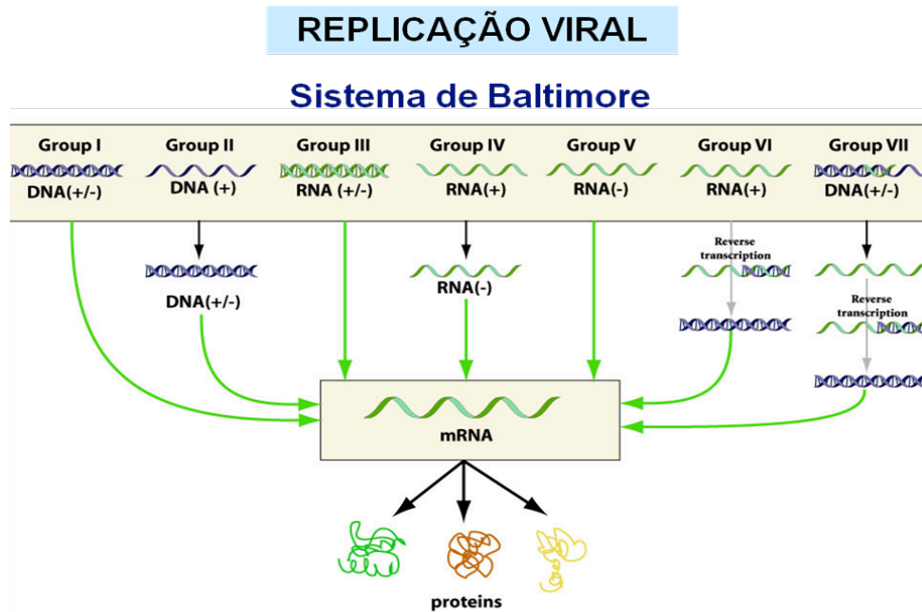
Depois da penetração na célula, sucede-se um período em que não é possível detectar partículas virais (**Fig 5**). Este é chamado de **período de eclipse**, que é seguido por um rápido aumento dos vírus presentes no meio de cultivo, reflexo de um período de crescimento, que se estabiliza quando as células 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 - Etapas da replicação viral**

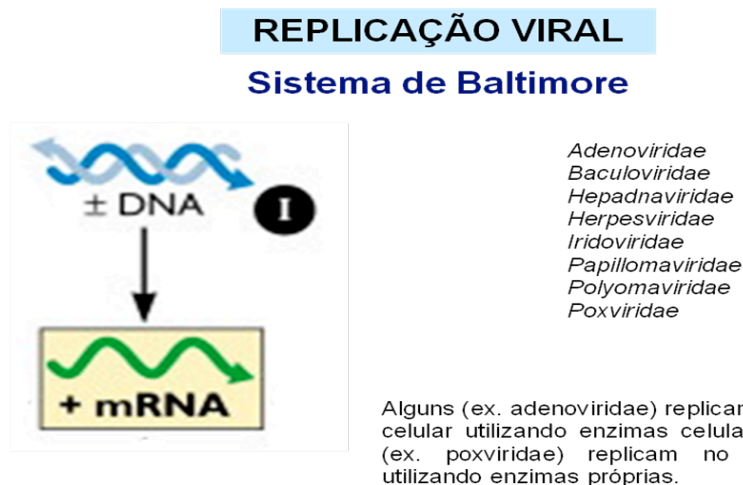


Um ponto-chave para entendermos as diferentes estratégias de replicação é o fato de que todo vírus em algum momento **precisa de mRNA**, para que suas proteínas sejam sintetizadas, seja qual for a natureza do genoma (**Fig. 6**).



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

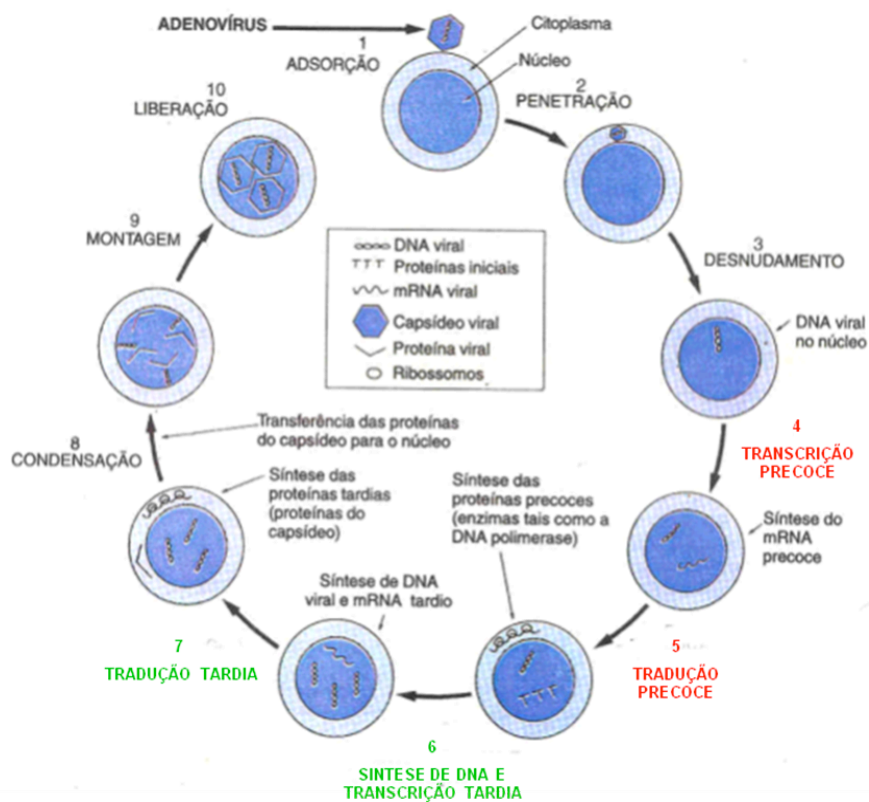
Além de produzir mRNAs para efetivar a expressão gênica, outro aspecto importante é de que os vírus também têm que multiplicar seus genomas. Assim, haverá necessidade de intermediários, dependendo do genoma viral considerado.



A replicação dos vírus do tipo I (DNA fita dupla) é feita em todos os casos pelo método semi-conservativo. Os genomas circulares de pequenas dimensões (ex: Poliomavirus) replicam-se por meio de forquilha bidirecional, a partir de uma única origem, como os plasmídeos bacterianos. Entre os vírus de animais, a replicação ocorre principalmente no núcleo, usando enzimas celulares.

Uma exceção são os Poxvírus, cuja replicação ocorre em corpúsculos de inclusão no citoplasma, usando enzimas codificadas pelos vírus, a mais importante delas é a DNA polimerase.

Como regra geral, os genomas virais DNA fita dupla devem estar dentro do núcleo para que seus genes possam ser expressos, como é o caso dos adenovírus. No núcleo o genoma viral estará interagindo com fatores que estimulam transcrição dos genes celulares. Nos genomas virais são encontradas sequências que respondem a sinais de estímulo à transcrição, como por exemplo, para ativação por hormônios. Ocorre então a expressão de um conjunto inicial de genes virais, o que é chamado de **transcrição precoce**. Os genes virais dessa fase, cujas proteínas são produzidas na **tradução precoce**, são tipicamente regulatórios coordenando a expressão dos genes virais e podendo também interferir no padrão de expressão gênica das células. As células são então preparadas para a fase seguinte em que ocorrem a **transcrição e traduções tardias**. Temos então a replicação do genoma viral e a síntese das proteínas estruturais dos vírus e no caso da replicação dos adenovírus, a montagem das partículas virais ocorre no núcleo **Fig 7**.



**Fig 7**

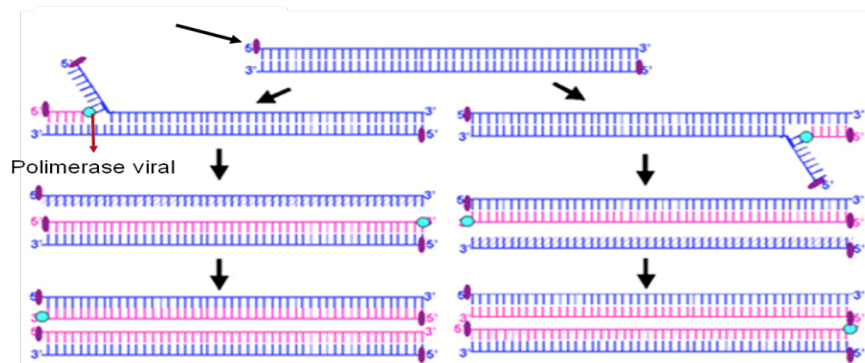
A exceção dentre os vírus humanos com genoma de DNA fita dupla são os Poxvírus (Ex: varíola, vaccínia). Como são vírus com genomas muito grandes, têm independência maior com relação às funções nucleares. Eles têm por exemplo as suas próprias DNA e RNA polimerases, e fazem o processo de replicação no citoplasma, como mencionado acima, 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.

## REPLICAÇÃO VIRAL ADENOVÍRUS

- Os adenovírus utilizam a RNA polimerase da célula hospedeira.
- Os adenovírus codificam a própria DNA polimerase (proteína precoce).
- Utiliza uma proteína como "primer"
- O DNA é replicado pelo "strand displacement mechanism".
- Não existem fragmentos de Okazaki e as duas fitas são sintetizadas em forma contínua.

## REPLICAÇÃO VIRAL ADENOVÍRUS

FASE TARDIA: Replicação por "strand displacement"

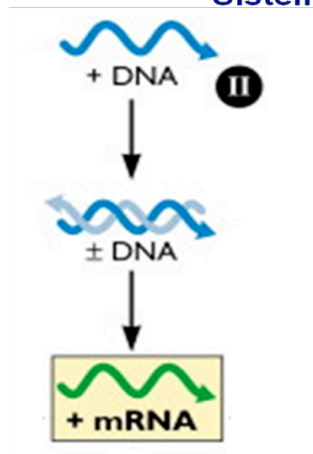


**Fig. 8- Mecanismo de replicação do DNA do adenovírus por "strand displacement".**

O adenovírus possui uma proteína que é covalentemente ligada à extremidade 5' de seu genoma e age como um iniciador para que a DNA polimerase sintetize uma nova fita de DNA. Essa proteína funciona como iniciadora porque fornece uma hidroxila para que aconteça a ligação com o grupamento tri-fosfato presente no nucleotídeo a ser incorporado. À medida que a DNA polimerase vai adicionando os nucleotídeos complementares à fita molde, a fita que não é molde vai sendo deslocada, daí o nome "strand displacement" (Fig8).

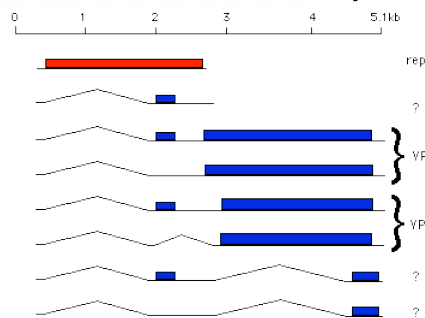
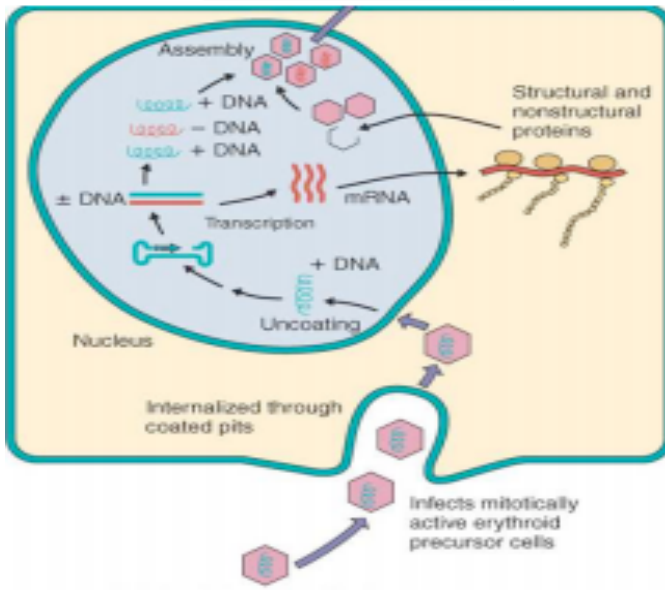
# REPLICAÇÃO VIRAL

## Sistema de Baltimore



*Parvoviridae*

Replicação nuclear dependente de enzimas celulares.

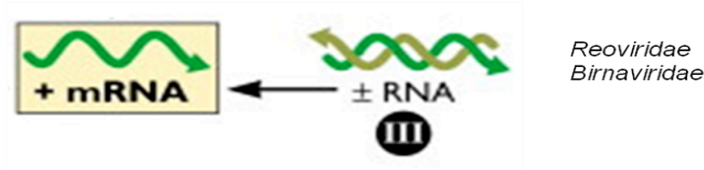


**Fig 9.** Ciclo de replicação dos parvovírus, detalhes das extremidades do genoma e das proteínas que codifica.

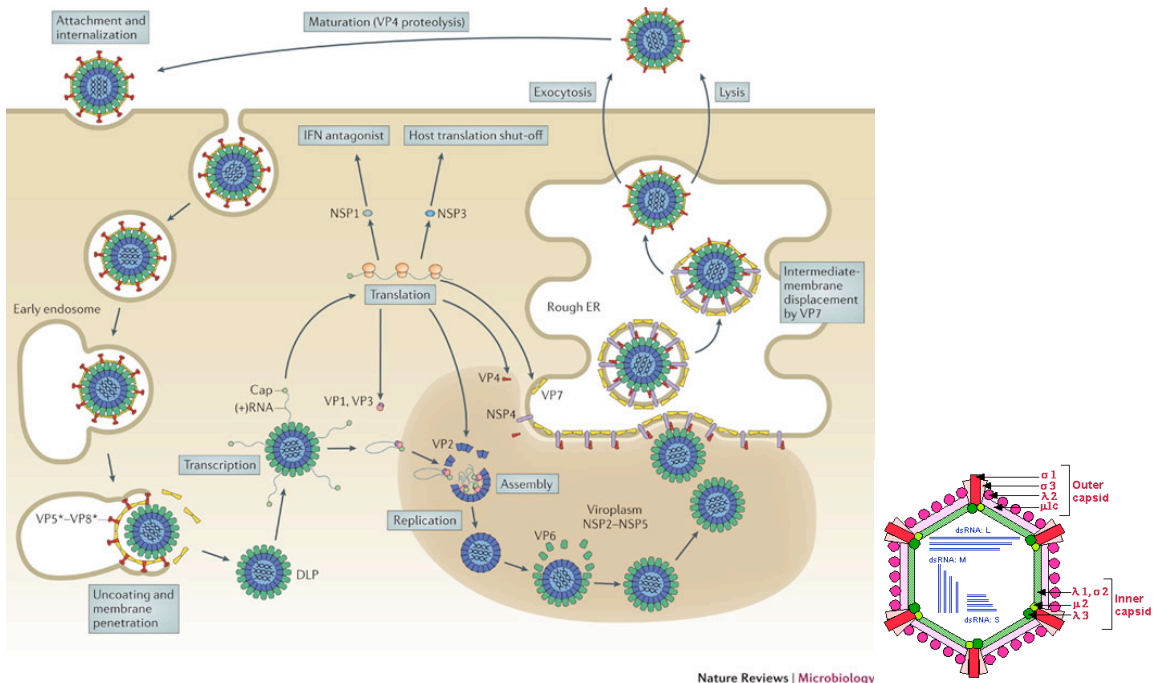
A replicação das formas de vírus do tipo II requer a formação de um intermediário replicativo de DNA dupla fita. Esse intermediário é formado bem cedo após a infecção, pelas DNA polimerases da célula hospedeira envolvidas na "reparação" de regiões de DNA fita simples. O genoma codifica proteínas estruturais (VPs), e uma recombinase (Rep) que insere o genoma do vírus no genoma celular, e posteriormente dele retira fitas simples durante a replicação (**Fig. 9**).

# REPLICAÇÃO VIRAL

## Sistema de Baltimore



Genoma segmentado. Cada segmento é transcrito para produzir um mRNA monocistônico. Replicação citoplasmática.

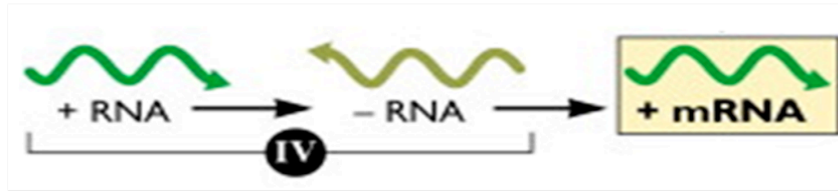


**Fig 10.** Ciclo de replicação do rotavírus (Reoviridae) e esquema detalhado da partícula viral

A partícula do rotavírus carrega RNA polimerases dependentes de RNA, as quais irão sintetizar RNA<sup>+</sup> (fita simples) a partir do RNA de fita dupla no interior dos capsídeos permeabilizados para entrada de nucleotídeos, no citoplasma (**Fig 10**). Estas moléculas de RNA<sup>+</sup> fita simples irão atuar tanto como mRNA, para a síntese de proteínas, quanto como moldes para a síntese de fitas complementares (RNA<sup>-</sup>) recompondo o RNA dupla fita dentro de novas partículas virais em processo de montagem. 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 resposta antiviral.

# REPLICAÇÃO VIRAL

## Sistema de Baltimore



Astroviridae  
Caliciviridae  
Coronaviridae  
Flaviviridae  
Picornaviridae  
Togaviridae

Replicação citoplasmática.

a) Genoma = mRNA. mRNA é infeccioso!!!  
Produção direta de uma poliproteína (vírus da hepatite A, *Picornaviridae*).

b) Padrão complexo de transcrição e tradução  
(ex. *Togaviridae*)

No caso de um vírus com genoma de RNA simples fita positivo (RNA+) (vírus do tipo IV) que funcione como mRNA, ao entrar na célula este pode ser utilizado imediatamente pelos ribossomos para traduzir as proteínas virais (Fig 11). A RNA polimerase RNA-dependente viral, codificada no genoma e produzida nessa primeira etapa 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. Esse tipo de genoma viral é dito infeccioso, ou seja se for inoculado artificialmente no citoplasma de uma célula, dará origem a partículas virais. Essa sequência de eventos pode ser apreciada de modo esquemático à Fig 11, tendo como exemplo o vírus da poliomielite.

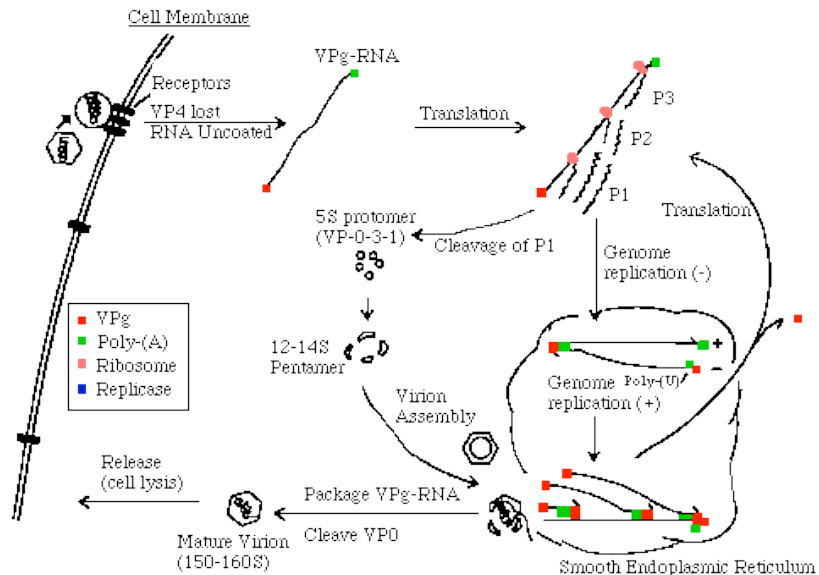
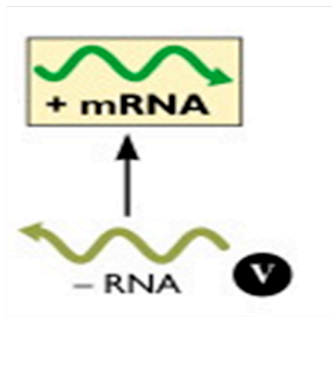


Fig 11. Ciclo de replicação do vírus da poliomielite.



## REPLICAÇÃO VIRAL

### Sistema de Baltimore



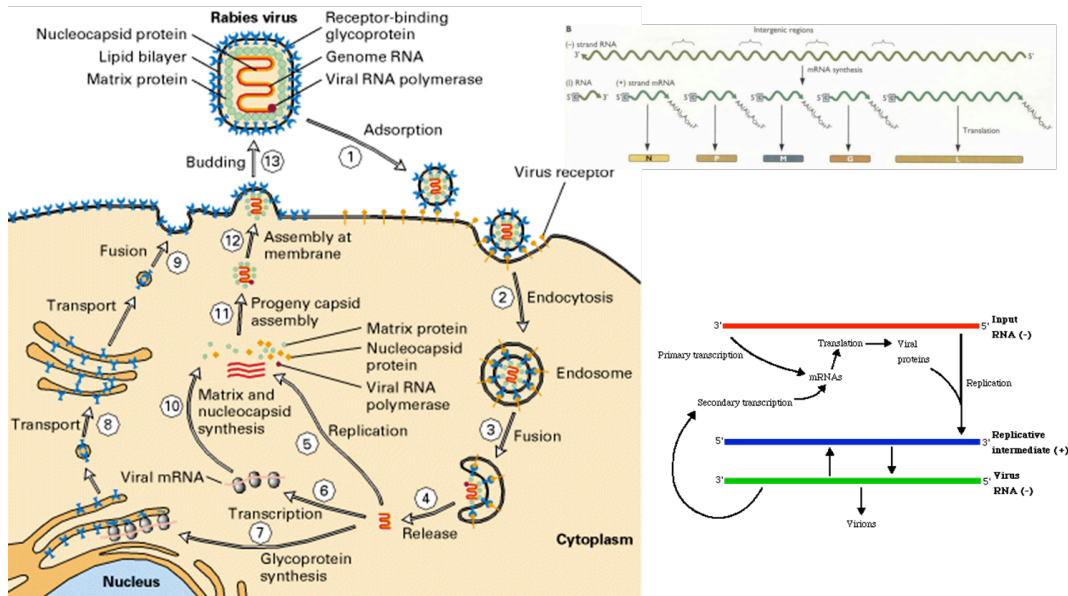
*Filoviridae*  
*Rhabdoviridae*  
*Bunyaviridae*  
*Orthomyxoviridae*  
*Paramyxoviridae*  
*Arenaviridae*

○ RNA (-) deve ser transcrito por uma RNA polimerase dependente de RNA, de origem viral.

Se considerarmos um vírus com genoma 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. Além das proteínas estruturais de envelope e capsídeo, 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. 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. Essa sequência de eventos pode ser apreciada tendo como exemplo o vírus da Raiva à **Fig 12**. As famílias *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae* (Influenza) e *Arenaviridae* possuem genomas segmentados. Os ortomixovírus replicam no núcleo como será detalhado na aula sobre Influenza.

## REPLICAÇÃO VIRAL

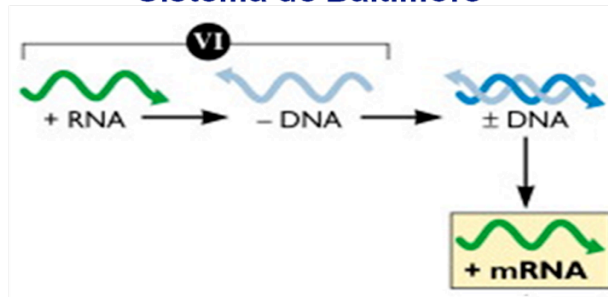
### Vírus da raiva



**Fig. 12-** Ciclo replicativo do vírus da raiva

## REPLICAÇÃO VIRAL

### Sistema de Baltimore



*Retroviridae*

Genoma DIPLOIDE, não serve como mRNA.

Existe transcrição reversa de RNA para DNA e uma etapa obrigatória de integração no genoma da célula hospedeira.

Os Retrovírus são envelopados e liberam seus capsídeos no citoplasma das células hospedeiras, quando as duas cópias do seu genoma (dois mRNAs) são submetidas ao processo de transcrição reversa (RNA → DNA) pela enzima transcriptase reversa que está no interior do capsídeo. Ocorre a formação de um DNA dupla fita que é transportado para o núcleo da célula, formando um complexo com outra enzima viral a integrase. Esta insere o genoma viral no genoma celular, que passa a ser chamado de pro-vírus e deste genoma viral 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.

## REPLICAÇÃO VIRAL

### RETROVÍRUS

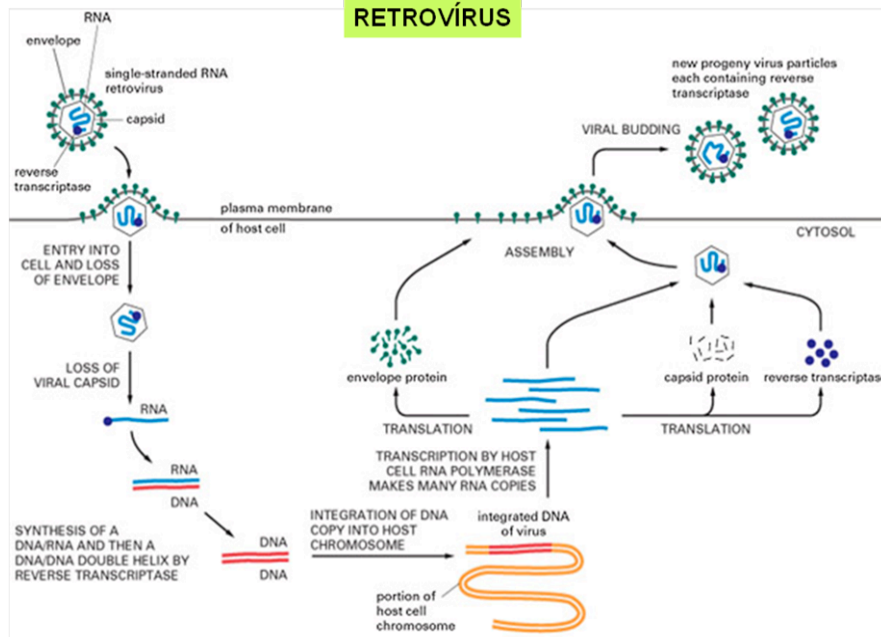
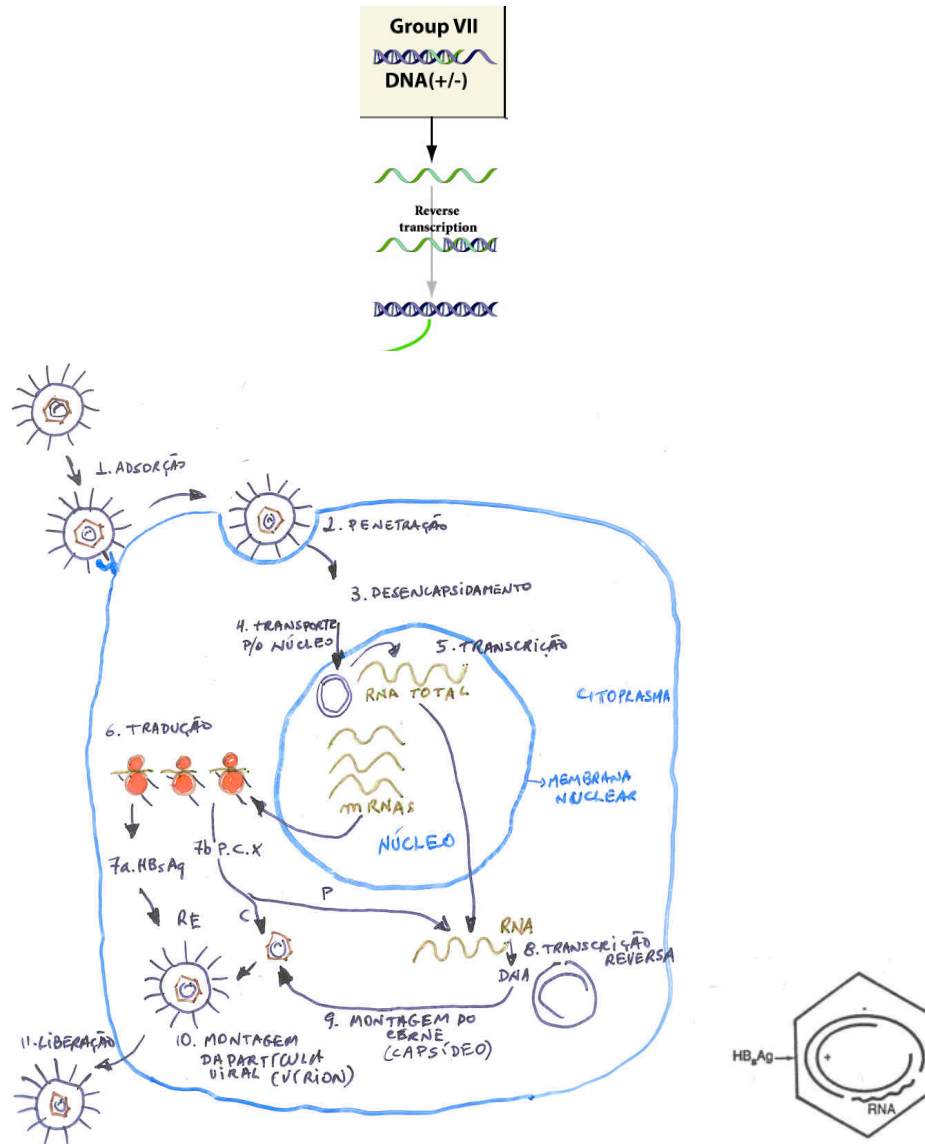


Fig. 13 - Ciclo de replicação dos retrovírus

## Grupo VII – DNA dupla fita com intermediário de RNA (Hepadnavírus)



**Fig 14. Ciclo do Hepadnavírus e esquema do genoma na partícula viral**

Finalmente, devemos comentar a família dos hepadnavírus (hepatite B), que na partícula viral contém um genoma de DNA dupla fita com regiões de fita simples e restos de RNA (Fig 14). Esse genoma é inserido no núcleo das células hospedeiras, sendo reparado e circularizado, para posteriormente ser transcrito produzindo os mRNAs virais. No entanto, é também gerado um “RNA total” que ao chegar no citoplasma serve de molde para a síntese do genoma viral (DNA), por um processo de transcrição reversa, feito pela polimerase viral! Esse processo de transcrição reversa deixa as falhas observadas no genoma que é encapsulado no processo de montagem da partícula viral. 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).

## Montagem e liberação das partículas virais.

Após o acúmulo de proteínas estruturais e genomas virais em quantidade suficiente, inicia-se a **montagem** das partículas virais em 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.

### • Maturação intracelular e liberação dos vírus sem envelope

- Vírus não envelopado já sai pronto do citoplasma (RNA) ou núcleo (DNA) sendo liberados, quando ocorre a destruição das células infectadas.

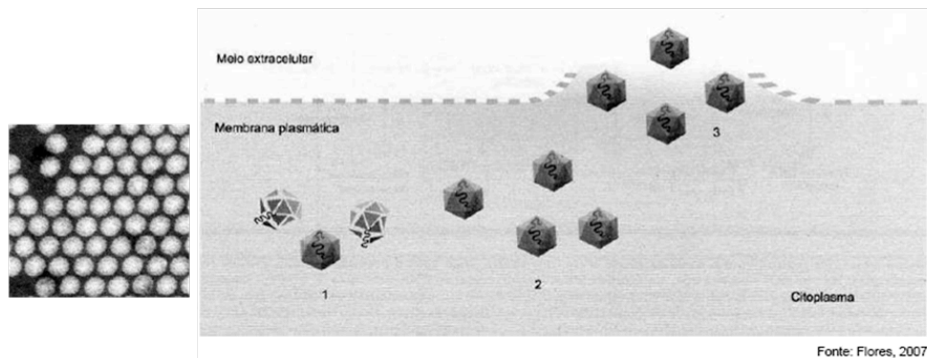
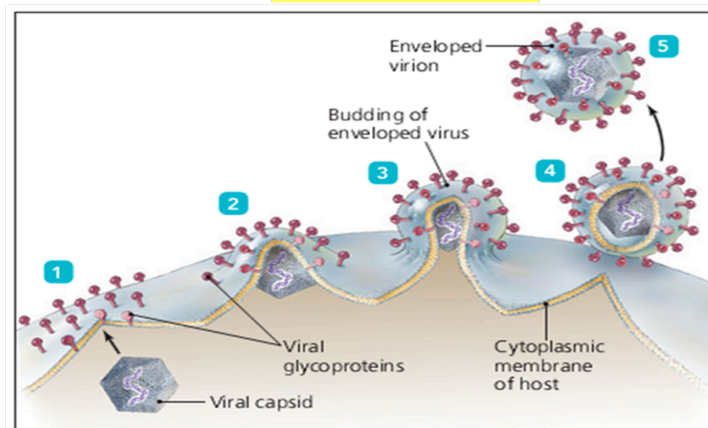


Fig. 15- Liberação por lise

## REPLICAÇÃO VIRAL

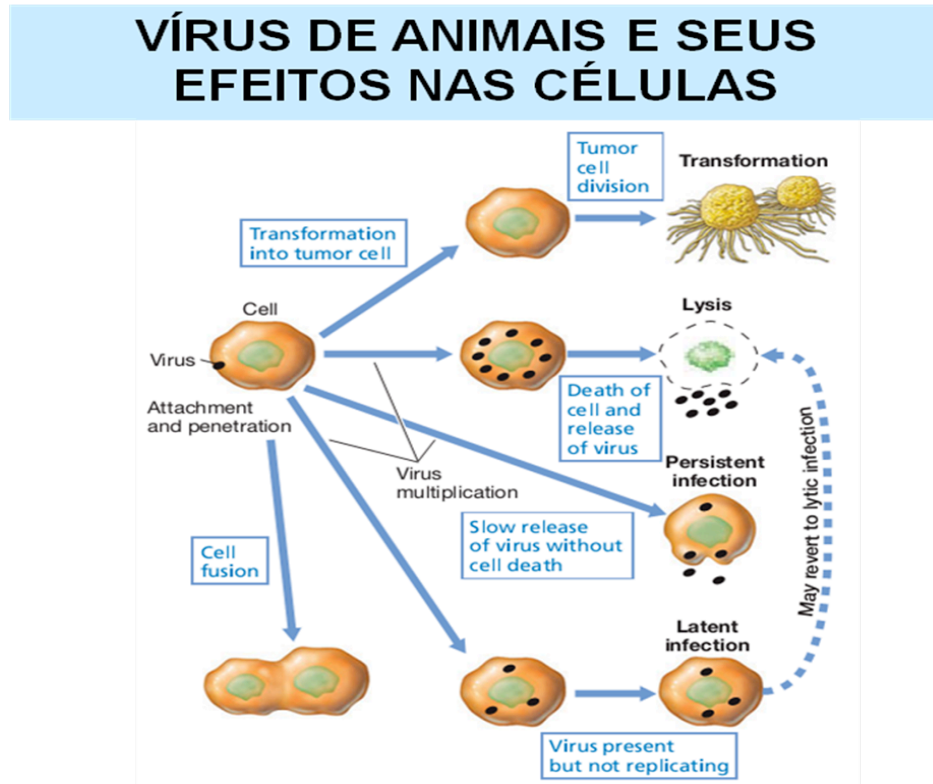
### Liberação



### Brotamento

Fig. 16- Liberação por brotamento

Os vírus podem causar diferentes efeitos nas suas células hospedeiras, que incluem lise, fusão de células, indução de transformação maligna, persistência e latência. Todos esses efeitos (**Fig 17**) estão intimamente relacionados com o mecanismo de replicação viral.



**Fig 17.** Possíveis efeitos causados em células pela infecção viral.