

BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia

Prof. Armando Ventura

Apostila de Virologia

Retrovírus

Os retrovírus infectam uma grande variedade de espécies animais, causando patologias diversas como tumores, doenças auto-imunes, síndromes de imunodeficiência e anemias. Seu nome deriva-se do fato de que a partícula viral contém uma DNA polimerase RNA-dependente (**transcriptase reversa**), enzima que converte o RNA genômico viral em DNA dupla fita, que é então integrado no DNA celular. A transcriptase reversa é propensa à inserção de bases com pareamento errôneo, levando a uma grande variação genética, característica bastante acentuada para alguns desses vírus.

Devido ao seu modo de replicação, com esses eventos de integração no genoma dos seus hospedeiros, os retrovírus causam consequências evolutivas. Isso pode ser inferido, por exemplo, pelos estimados 4 a 8 por cento do genoma humano constituído de sequências retrovirais endógenas. Essas sequências derivadas de retrovírus que integraram ao genoma no passado, perderam suas funções originais passando posteriormente de geração a geração.

Classificação

Dentre os retrovírus, há muitos vírus defectivos, ou seja, em que houve perda de um gene essencial para a replicação. Assim, só conseguem fazer infecção produtiva se a célula alvo está também infectada com um vírus auxiliar (“helper”) que lhes fornece a função do gene perdido. Essa característica é muito presente nos retrovírus oncogênicos. Outra característica é o carreamento de segmentos do genoma celular devido ao mecanismo de integração. No evento de transcrição que gera o RNA genômico viral, regiões vizinhas podem ser incorporadas acidentalmente. O vírus do sarcoma de Rous (RSV, table 1), que causa tumor em galinhas, foi um modelo importante para evidenciar esse fenômeno pois incorporou a sequência do oncogene celular src.

Atualmente a família **Retroviridae** é dividida em sete gêneros (*table 1*, retirada de Fields, Virology).

New name	Examples	Morphology
Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV) Rous sarcoma virus (RSV)	C-type
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV) Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)	B-, D-type
Gammaretrovirus	Murine leukemia viruses (MuLV) Feline leukemia virus (FeLV) Gibbon ape leukemia virus (GaLV) Reticuloendotheliosis virus (REV)	C-type
Deltaretrovirus	Human T-lymphotropic virus (HTLV)-1, -2 Bovine leukemia virus (BLV)	—
Epsilonretrovirus	Simian T-lymphotropic virus (STLV)-1, -2, -3 Walleye dermal sarcoma virus Walleye epidermal hyperplasia virus 1	—
Lentivirus	Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) HIV-2 Simian immunodeficiency virus (SIV) Equine infectious anemia virus (EIAV) Feline immunodeficiency virus (FIV) Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) Visna/maedi virus	Rod/cone core
Spumavirus	Human foamy virus (HFV)	Immature

Anteriormente os retrovírus eram organizados em três subfamílias.

Oncovirinae (compreendendo os atuais gêneros alfa, beta, gama, delta e epsilonvírus) - oncogênicos - causam sarcomas e leucemias.

Ex.: Vírus do Sarcoma de Rous (galinhas), Vírus da Leucemia de Molonei (roedores), Vírus da leucemia humana de células T (HTLV)

Lentivirinae - doenças degenerativas de progressão lenta.

Ex.: Visnavirus (ovelhas); Vírus da imunodeficiência de símios (SIV); Vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Spumavirinae - não há patologia conhecida a eles associada.

Estrutura e Replicação

São vírus envelopados com glicoproteínas na superfície, que exercem a função de anti-receptores. Abaixo desse envelope há uma primeira capa proteica formada pela proteína de matriz, e que envolve um nucleocapsídeo, que contém além do genoma de RNA associado à nucleoproteína, as enzimas transcriptase reversa e integrase (**Fig. 1**). Os retrovírus têm um genoma diplóide (2 cópias de RNA genômico por partícula viral). O genoma codifica pelo menos três genes: **gag**, **pol** e **env**, e constitui-se de um RNA mensageiro associado a um tRNA (**Fig. 2**). Esse tRNA serve como iniciador (“primer”) para a reação de transcrição reversa. Os genes codificam para as proteínas estruturais do capsídeo viral (gag), transcriptase reversa/integrase (pol) e glicoproteína de envelope (env).

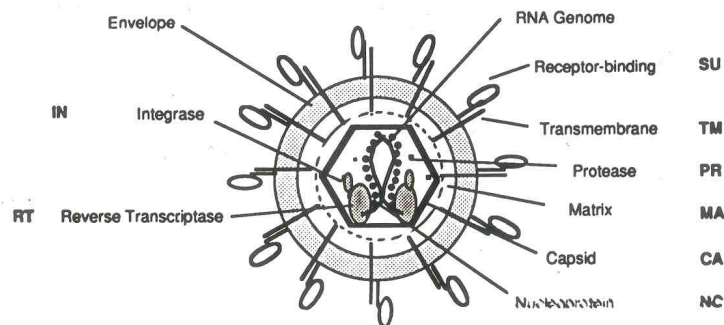


Fig. 1

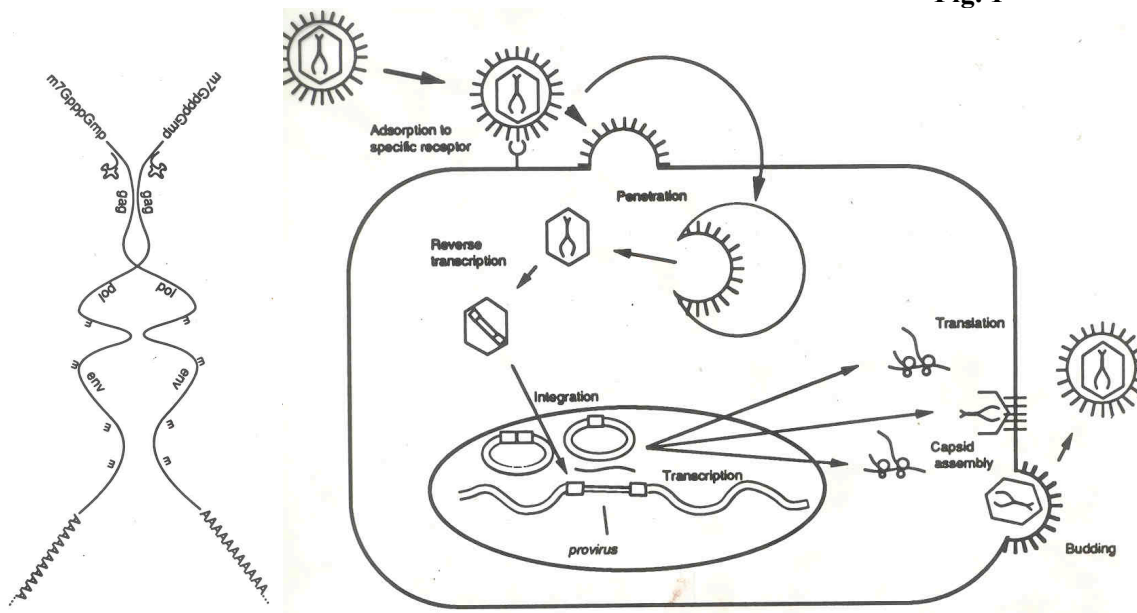


Fig. 2

Fig. 3

A replicação inicia-se com a interação entre o receptor na membrana citoplasmática da célula e a glicoproteína do envelope viral, seguindo-se a fusão (ou endocitose seguida de fusão) e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (**Fig. 3**). Como regra geral, no trânsito do nucleocapsídeo viral para o núcleo da célula ocorre o processo de transcrição reversa, formando-se um DNA dupla fita em que os genes virais são flanqueados por uma sequência repetida, a terminação repetitiva longa (“Long terminal repeat” ou LTR). Esse processo executado pela transcriptase reversa não tem o seu mecanismo completamente elucidado, mas existem modelos baseados nos intermediários detectados (**Fig. 4**). Na transcrição reversa, uma série de reações em que o RNA viral é degradado após servir de molde, segue-se de uma fase final em que o DNA simples fita recém sintetizado serve de molde, originando o DNA dupla fita com a criação de duas cópias da LTR nas extremidades do genoma. As LTRs permitem que esse DNA seja inserido no genoma celular em pontos aleatórios pela ação da integrase, gerando o que é chamado de DNA pró-viral (**Fig. 3**).

A LTR 5' é uma sequência reguladora, ou um promotor do processo de transcrição dos mRNAs virais, e possui elementos (sequências de bases características) que também existem em promotores de genes celulares, como o TATA box e elementos de resposta a hormônios glicocorticoides (GRE, **Fig. 5**). Dessa forma o DNA pró-viral passa a comportar-se como um gene celular com a expressão regulada pela LTR, que pode responder a estímulos como ação de hormônios, estresse, entre outros. Além disso, nela existe uma sequência de nucleotídeos, chamada de sequência empacotadora (frequentemente representada pela letra grega psi), que estará presente no RNA genômico do vírus e que será reconhecida para sua captura pelo nucleocapsídeo, durante o processo de montagem.

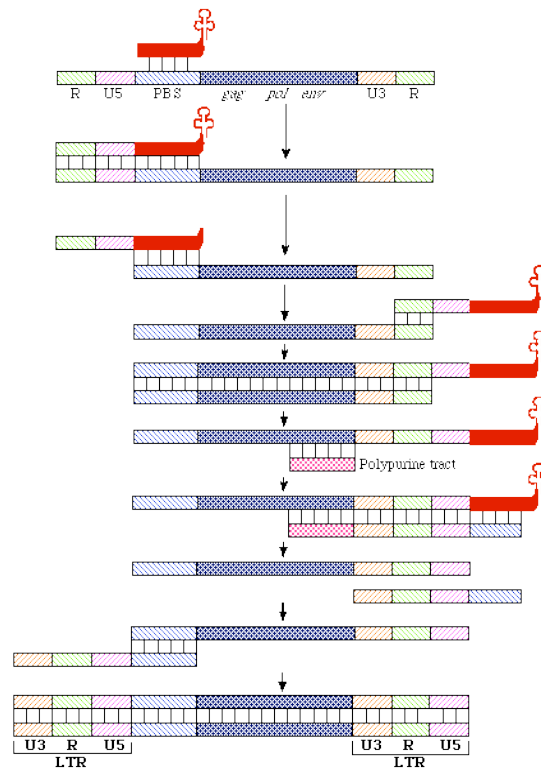


Fig. 4. Intermediários da transcrição reversa (modelo)

HIVs 1 e 2, virus causadores de imunodeficiência em humanos.

Epidemiologia

Em 1981, foi observado que homossexuais do sexo masculino em Nova Iorque e Los Angeles estavam sofrendo de imunodeficiência grave, associada a infecções oportunistas e tumores de pele incomuns em pessoas jovens. Suspeitou-se que um agente infeccioso estivesse envolvido, especialmente pelo fato de que a doença estava se espalhando a hemofílicos através de transfusão sanguínea. Em 1983 um novo retrovírus foi isolado, e batizado de LAV (*lymphadenopathy associated virus*), de um paciente com linfadenopatia generalizada. Em 1986 outro vírus muito parecido também foi isolado de um paciente com imunodeficiência. Posteriormente houve uma unificação da nomenclatura e passaram a ser chamados de HIV1 e HIV2, respectivamente, devido a serem agentes etiológicos da imunodeficiência humana adquirida.

Estima-se que 34 (31,4 a 35,9) milhões de pessoas estão infectadas em todo o globo, e que o número de novas infecções pelo HIV em 2011 foi em torno de 2,5 milhões com 1,7 milhões de mortes. Mais de 95% dos casos são em países com populações de renda média e baixa, sendo a África ao sul do Saara (23,5 milhões), e o sul e sudeste asiático (4,0 milhões) as regiões com maior número de casos. Perto de 10% do total são crianças abaixo de 15 anos, havendo igual distribuição entre homens e mulheres (Fig 7, fonte: UNAIDS/WHO). No Brasil o Programa Nacional de DST e AIDS (www.aids.gov.br) tem sido eficiente no combate à AIDS com uma queda progressiva do número de casos notificados de 1998 em diante (Figs 8 e 9). Desde o início da epidemia, em 1980, até junho de 2012, O Brasil tem 656.701 casos registrados de AIDS condição em que a doença já se manifestou), de acordo com o último Boletim Epidemiológico. Em 2011, foram notificados 38.776 casos da doença e a taxa de incidência de AIDS no Brasil foi de 20,2 casos por 100 mil habitantes. Mais recentemente (2015), no entanto, o número de casos vem aumentando entre jovens.

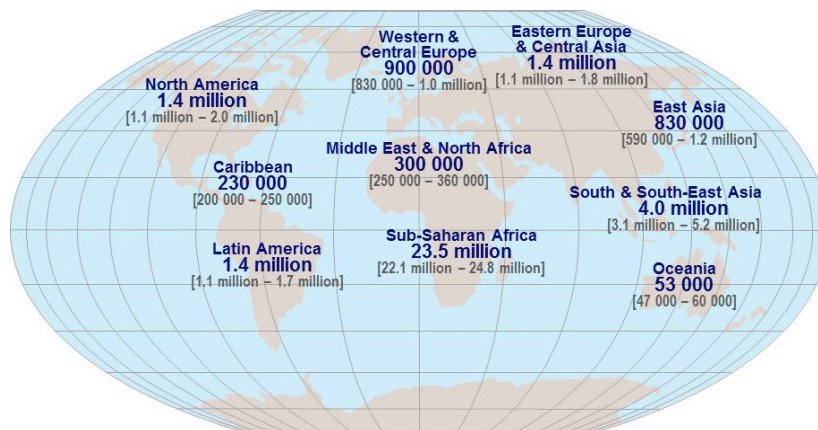


Fig. 7.

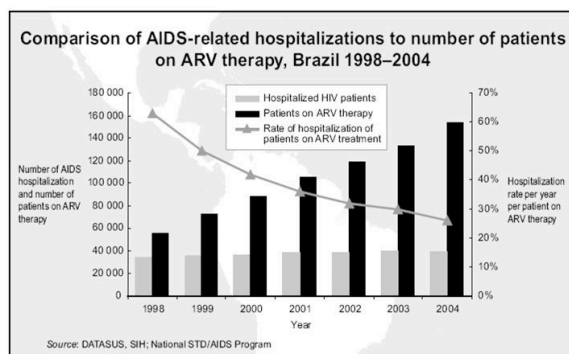


Fig. 8.

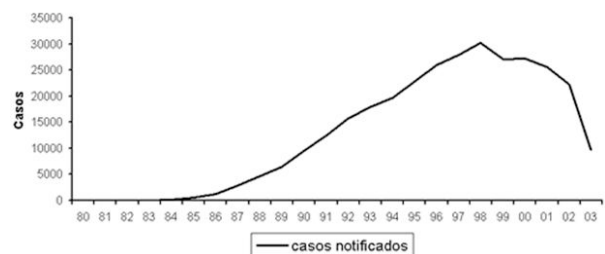


Fig. 9.

O HIV1 é o maior responsável por essa pandemia, enquanto o HIV2 continua confinado à costa oeste da África (Senegal, Costa do Marfim, Guiné-Bissau). Esses vírus têm apenas 40% de similaridade na sequência de nucleotídeos. O HIV1 é mais próximo de um outro vírus, o SIV_{cpz} (vírus da imunodeficiência de símios que infecta chimpanzés), do que do HIV2. Por sua vez, o HIV2 é mais próximo de um outro vírus, o SIV_{smm} (que infecta o *sooty mangabey monkey*), do que do HIV1. Isso mostra uma divergência filogenética acentuada entre eles. O próprio HIV1 é subdividido nos grupos: M (major, 95%); O (outlier, prevalente em Camarões, Gabão, Guiné-Bissau); e N (non-M ou O, prevalente em Camarões). Destes o grupo M é o grande responsável pela pandemia, sendo subdividido em oito tipos (A, B, C, E, F, G, H, J), dos quais o B é o mais prevalente mundialmente, inclusive aqui no Brasil (Fig. 10.,UNAIDS/WHO).

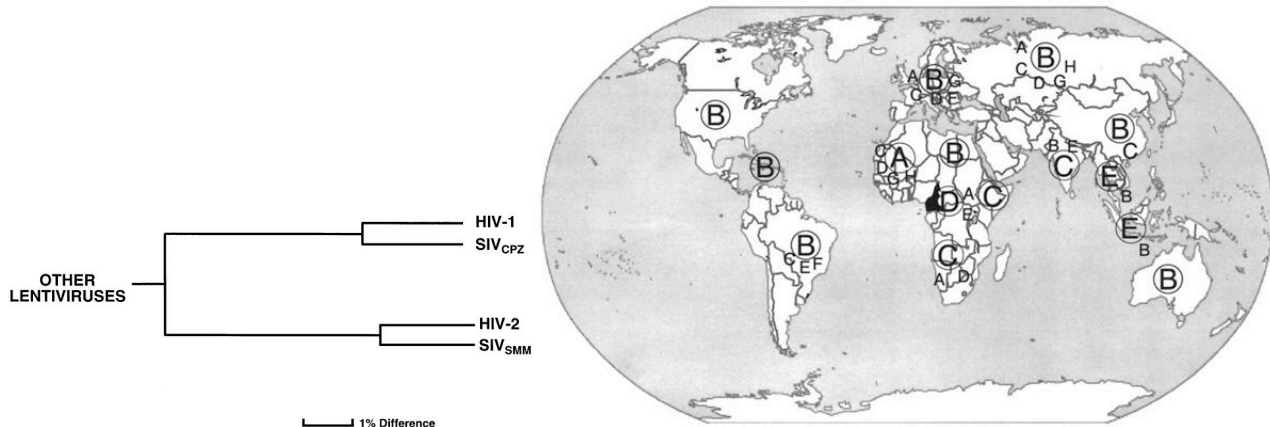


Fig. 10.

Transmissão e Patogenia

A partícula do HIV observada à microscopia eletrônica apresenta como característica marcante um nucleocapsídeo em forma de cone, além das espículas de glicoproteínas bem evidentes na superfície do envelope (Fig. 11).

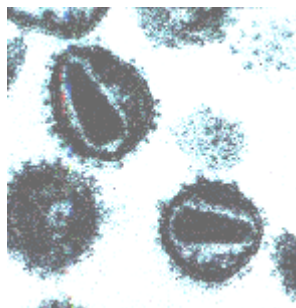


Fig. 11

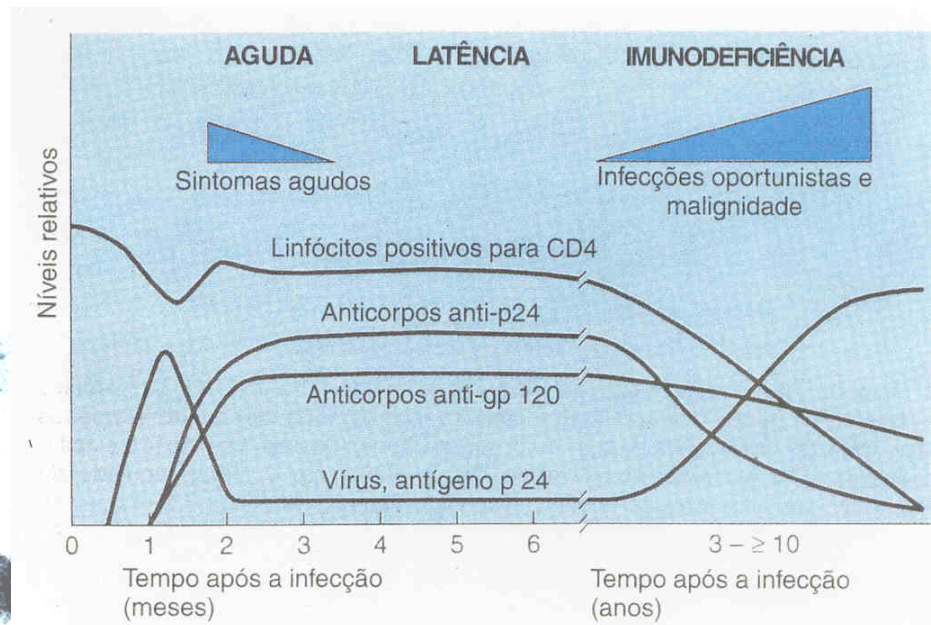


Fig. 12

O modo de transmissão do HIV é através do sangue, relações sexuais e verticalmente, da mãe infectada para o feto ao final do desenvolvimento, durante o parto, ou o aleitamento. Os sintomas iniciais são leves ou imperceptíveis, com o surgimento de anticorpos em torno de quatro semanas, sendo detectada uma pequena queda na quantidade de linfócitos T4. A seguir, a quantidade de vírus no sangue cai para níveis muito baixos, sendo mantido um nível de linfócitos T4 próximo ao normal. Anticorpos contra as proteínas virais (principalmente a p24 do capsídeo e a gp120 do envelope) permanecem em níveis elevados (**Fig. 12**).

Antes de surgirem testes mais sensíveis, baseados na detecção do genoma viral, acreditava-se que o vírus desaparecia, pondo até em questão se o HIV era mesmo o agente causal da AIDS. Hoje se sabe que a replicação do vírus é contínua, na forma de pequenos surtos provocados por variantes. Essas variantes surgem devido ao processo de transcrição reversa, porque a enzima tem uma taxa de erro elevada inserindo mutações principalmente em regiões não essenciais dos genes. Assim o HIV multiplica-se muito não em quantidade, mas em diversos pontos do organismo durante a persistência assintomática. Na proteína de envelope gp120 há regiões que são antigênicas e muito variáveis, e que desafiam o sistema imune a montar constantemente novas respostas adaptativas. Esse embate (denominado por vezes “latência” da doença, e não do vírus) pode durar de três a dez anos ou mais, dependendo do indivíduo. Há várias hipóteses sobre o mecanismo de resistência dos indivíduos em que a doença demora mais a progredir, indo de mutações nos co-receptores celulares (comentados adiante) até variações no haplotipo dos MHCs (moléculas que apresentam peptídeos na superfície das células aos linfócitos, dando início à resposta imune).

Podemos assim, dividir a progressão da doença nas seguintes etapas:

1. Doença da soro-conversão: é observada em 10% dos indivíduos poucas semanas após exposição. É uma doença leve similar à mononucleose infecciosa causada pelo herpesvírus Epstein-Barr: febre, mal estar, fadiga, dores de garganta, aumento dos gânglios linfáticos do pescoço.
2. Período de incubação: é o período variável quando o paciente é completamente assintomático.
3. Complexo relacionado à AIDS: linfadenopatia persistente generalizada.
4. AIDS.

O paciente passa à fase final da síndrome de imunodeficiência, com o aparecimento das infecções oportunistas, aumento do HIV circulante (**Fig. 12**) e o aparecimento de tumores. Dentre as infecções oportunistas destacam-se: protozoários (toxoplasma, criptosporo), fungos (*Pneumocystis carinii*, cândida, criptococo, histoplasma, coccidioidomicose), bactérias (complexo *Micobacterium avium*, doença micobacteriana atípica, septicemia por salmonela, infecções bacterianas piogênicas múltiplas e recorrentes), e vírus da família herpes (Citomegalovírus, Herpes Simplex, Varicela Zóster). O tumor oportunista mais frequente, o sarcoma de Kaposi, é observado em 20% dos pacientes com AIDS, e verificou-se ser associado com o herpes vírus humano 8 (HHV-8). Linfomas são frequentemente observados em pacientes com AIDS.

Está estabelecido atualmente que pacientes infectados por HIV podem desenvolver várias manifestações clínicas que não são explicadas pelas infecções oportunistas ou tumores. Uma delas, a encefalopatia da AIDS, é a doença neurológica mais frequente sendo observada em dois terços dos casos. Outras manifestações importantes são erupções características na pele e diarreia persistente.

Particularidades na replicação do HIV

O receptor para o HIV constitui-se do marcador de superfície de linfócitos CD4, porém o vírus vale-se também do auxílio de co-receptores (CCR5 ou CXR4), outras proteínas (receptores de quimiocinas) presentes na membrana celular. As espículas presentes no envelope do HIV compõem-se de duas glicoproteínas, a gp41 que fica ancorada na membrana lipídica e a gp120 a ela ligada que fica mais exposta e interage com o receptor CD4. Após essa interação a gp41 promove a fusão da membrana citoplasmática com o envelope viral, auxiliada pelos co-receptores (**Fig. 13**). Os co-receptores não estão presentes de forma tão ampla nas células alvo do HIV quanto o CD4. Isso gera uma diferenciação no HIV a partir do momento em que entra no organismo, sendo possível caracterizar isolados virais com tropismos e habilidades diferenciadas (multiplicam-se preferencialmente em macrófagos ou linfócitos, crescem mais rápida ou lentamente, e formam ou não sincícios). Mutações nesses co-receptores podem tornar os indivíduos mais resistentes ao HIV.

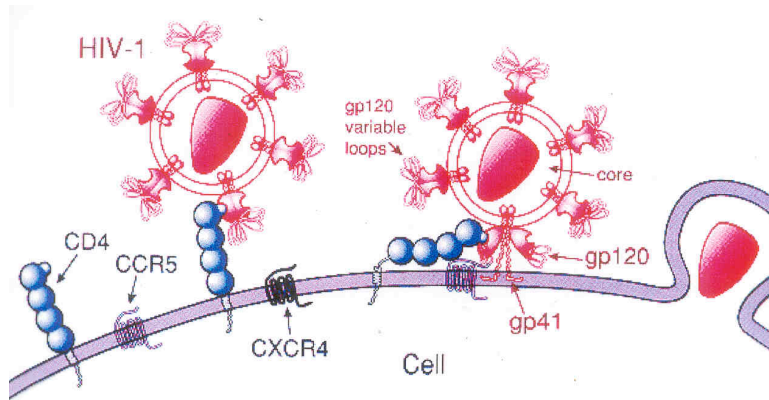


Fig. 13,

Quando analisamos o genoma dos HIVs e de outros retrovírus humanos como o HTLV (Fig. 14), notamos que sua estrutura é mais complexa do que a tradicional gag-pol-env dos retrovírus animais inicialmente estudados como o vírus da leucemia murina (MuLV). Há mRNAs provenientes do processamento alternativo do RNA transcrito a partir do genoma viral que codificam várias proteínas não estruturais, no caso do HIV1: TAT, REV, NEF, VIF, VPR e VPU. Essas proteínas têm função regulatória e as mais importantes, TAT e REV, são capazes de reconhecer sequências específicas no mRNA viral. TAT tem dois efeitos, faz com que a transcrição e a tradução dos mRNAs virais sejam mais eficientes. A consequência disso é que os genes têm um aumento de expressão da ordem de mil vezes, um dos mais poderosos estímulos desse tipo conhecidos. A proteína REV faz com que tanto o RNA genômico quanto o mRNA para ENV sejam transportados eficientemente do núcleo para o citoplasma. A somatória dos efeitos de TAT e REV é a produção de proteínas estruturais e do genoma do HIV em grande quantidade e uma replicação explosiva (Fig. 15), a um nível nunca visto para outro retrovírus, e que leva as células hospedeiras à morte.

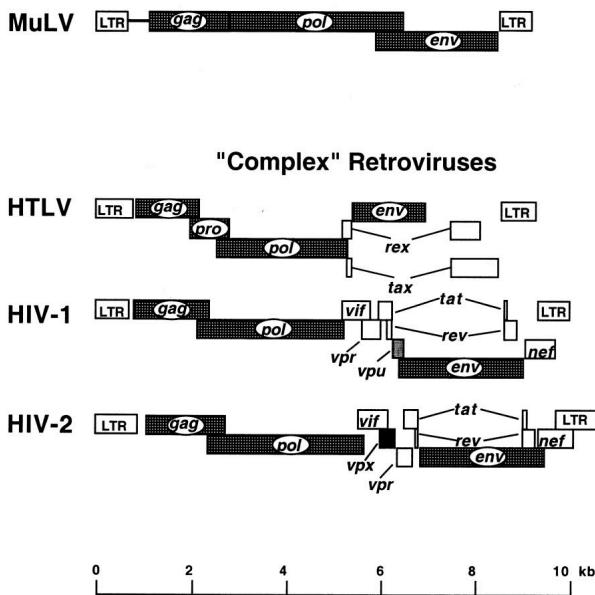


Fig14

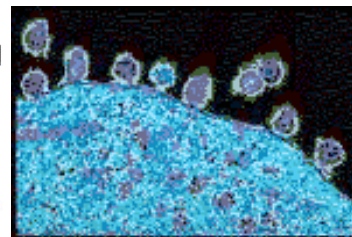


Fig. 15

O LTR na extremidade 5' do genoma viral integrado é a região controladora dos retrovírus como comentado acima (**Fig 5**), e mostrada com maior detalhe para os HIVs na **Fig 16**. Nela é possível identificar os elementos de um promotor típico para a RNAPol II celular, que contém o TATA box e elementos para a ligação de fatores de transcrição celulares. O que chama a atenção é a presença do NFκB, um elemento encontrado no promotor do gene da cadeia leve de imunoglobulinas. Esse elemento participa da resposta imune, e em linfócitos de memória é um dos responsáveis pela sinalização da expansão clonal. Esse sinal é aproveitado pelos HIVs para se multiplicarem.

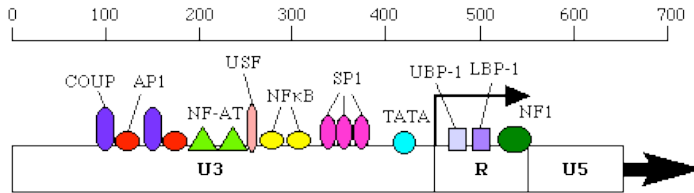


Fig. 16

Deve ser ressaltado que o vírus circulante no sangue do paciente, na fase da síndrome, apresenta-se com inúmeras variantes (quasiespécies), ao contrário da fase inicial em que encontramos uma ou poucas variantes. As mutações ocorrem também ao nível das enzimas virais como a transcriptase reversa e a protease, tornando o vírus resistente às drogas disponíveis.

Tratamento

O conhecimento acumulado sobre o HIV permitiu o desenvolvimento de várias estratégias de intervenção nas diferentes fases do ciclo replicativo do HIV (**Fig17**), apresentadas a seguir, e que podem ser válidas também para outros retrovírus.

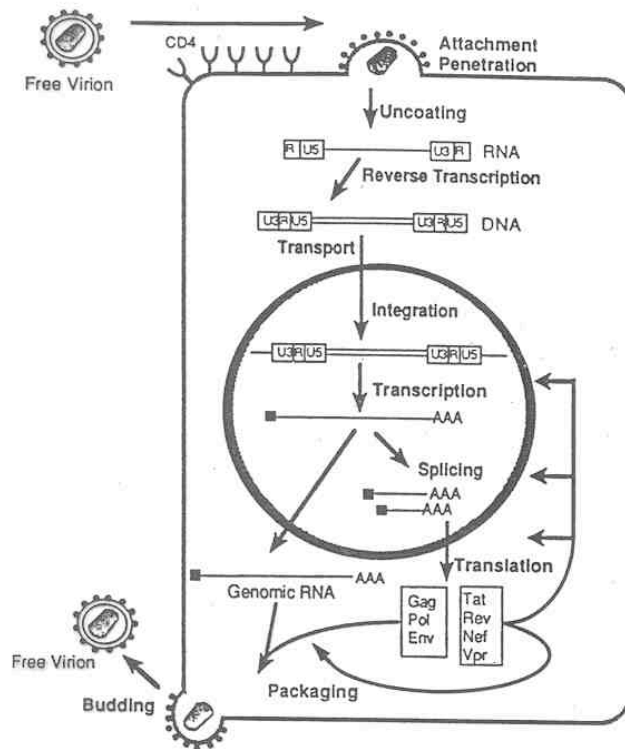


Fig. 17

Ligação. Uma parte da proteína CD4, chamada CD4 solúvel que se liga a gp120 foi testada, sendo esse peptídeo efetivo no bloqueio à replicação do HIV *in vitro*, mas foi pouco eficaz em testes clínicos.

Bloqueio da fusão. A enfuvirtida é um peptídeo sintético de 36 aminoácidos com alto grau de conservação de sequência entre cepas de HIV-1. Em razão disso, foi inicialmente desenvolvida como um possível componente de vacina. A enfuvirtida interage com a gp41, impedindo as mudanças conformacionais necessárias para fusão entre membrana celular e envelope viral. O HIV pode desenvolver resistência à enfuvirtida através de mutações em gp41. O maraviroque é uma droga não peptídica, antagonista do receptor de quimiocinas CCR5, que impede a ligação à gp120 e o disparo do mecanismo de fusão. Essas drogas são efetivas em uso clínico.

Transcrição reversa. Utilizando análogos de nucleosídeos como o AZT (azido timidina), a ddI (dideoxi-inosina) e o ddC (dideoxi-citosina) (**Fig. 18**). Esses análogos são inibidores eficientes da multiplicação do HIV, e foram as primeiras drogas aplicadas em uso clínico. Seu mecanismo de ação baseia-se no fato de terem grande afinidade pela transcriptase reversa, e ao serem incorporados na cadeia nascente de DNA bloquearem sua extensão por não possuírem o 3'OH. Há também inibidores não nucleosídicos, que interagem com a transcriptase reversa fora do sítio ativo.

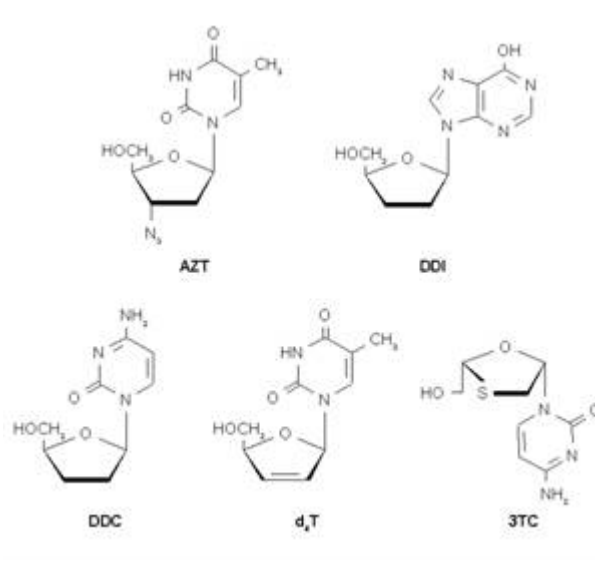


Fig 18

Integração. Os estudos com a integrase e a elucidação da sua estrutura (Goldgur *et al.* PNAS, vol. 96, 13040, 1999) levaram ao desenvolvimento de inibidores, como o Raltegravir (Merck) **Fig 19**.

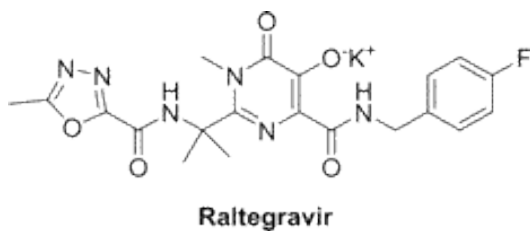


Fig 19

Transcrição. Foi demonstrado que mutantes dos genes regulatórios TAT e REV bloqueiam a ação dos genes selvagens (transporte e transcrição dos mRNAs virais), efeito chamado de trans-dominância, sendo efetivos em inibir a replicação do vírus em culturas celulares. Apesar da grande quantidade de informação obtida com esses mutantes, a perspectiva aplicação clínica é baixa, pois dependeria de expressar os genes dessas proteínas virais mutadas nos linfócitos dos pacientes.

Tradução. A utilização de RNAs “antisense” (que são complementares e pareiam com mRNAs virais) e ribozimas (RNAs com atividade enzimática específica contra um RNA alvo) para inativar os mRNAs virais foi muito explorada experimentalmente. Chegou-se até a testes clínicos de terapia gênica em andamento para avaliar a aplicação dessa estratégia em larga escala (informações em clinicaltrials.gov).

Excisão do pró-vírus nos reservatórios. Um problema fundamental na biologia do HIV é a persistência em células como macrófagos e linfócitos de memória, impedindo a cura. Tem havido um investimento no uso do sistema CRISPR/Cas9 contra sequencias do HIV para eliminar o vírus desses reservatórios, trazendo uma perspectiva de terapia genica e cura da AIDS. Sugestão de leitura: Excision of Latent HIV-1 from Infected Cells In Vivo: An Important Step Forward. Feelixge e Jerome, Molecular Therapy, Vol. 25 No 5, maio de 2017.

Montagem. Foram desenvolvidos inibidores da protease viral, que são peptídeos compostos dos aminoácidos alvos da clivagem pela protease, flanqueados por moléculas modificadas (**Fig. 20**). Esses inibidores foram selecionados com base na alta afinidade pelo sítio ativo, estabilidade molecular e biodisponibilidade, possibilitando sua administração como fármacos. Quando utilizados isoladamente, porém, não mostraram bons resultados na clínica.

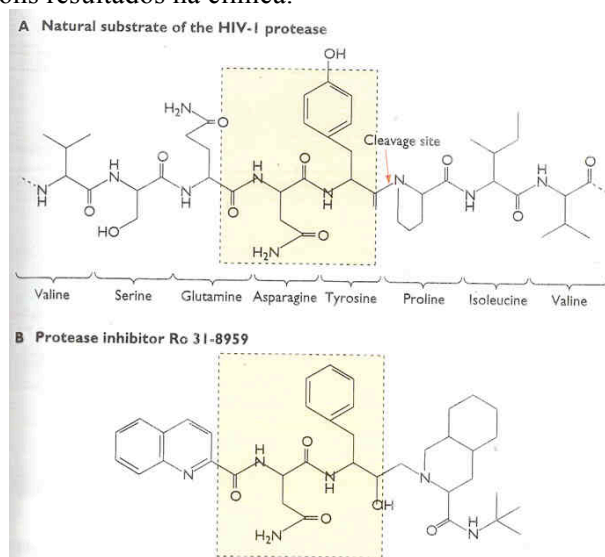
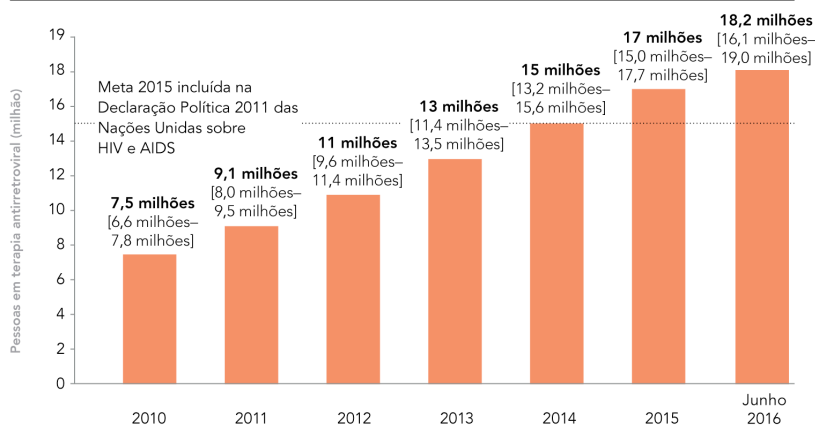


Fig 20

HAART (*highly active anti-retroviral therapy*).

Os inibidores da protease mostraram-se **efetivos**, em uso clínico quando associados a inibidores da transcriptase reversa, formando um “**coquetel**” muito eficiente, que permitiu prolongar significativamente a sobrevida dos pacientes. Atualmente a esses coquetéis são incorporados também os inibidores da integrase e drogas de nova geração. O progresso na formulação de medicamentos associando várias dessas drogas tem sido fundamental para facilitar a administração, que deve ser rotineira, e provoca efeitos colaterais. O uso da HAART foi aumentando progressivamente e atualmente temos mais de 18 milhões de portadores de HIV usufruindo dessas formulações Fig 21, com melhoria significativa da qualidade de vida.

Número de pessoas vivendo com HIV em terapia antirretroviral, globalmente, 2010-2016



Fonte: Global AIDS Response Progress Reporting (GARPR) 2016; Estimativas UNAIDS 2016.

Fig 21

Prevenção

O risco de contrair HIV aumenta com o número de parceiros sexuais, assim uma mudança no estilo de vida, além do uso de preservativos, reduz drasticamente esse risco. Nesse sentido, campanhas educativas têm se mostrado efetivas na diminuição da incidência da AIDS. A transmissão do HIV através da transfusão e derivados do sangue foi virtualmente eliminada após a introdução dos testes no sangue dos doadores, na maioria dos países. Outro aspecto importante é que o AZT mostrou-se efetivo na prevenção da transmissão da mãe para o feto, reduzindo a incidência de infecção em bebês em dois terços.

A perspectiva de desenvolvimento de uma vacina anti HIV esbarra num grande obstáculo que é o fato dos anticorpos neutralizantes, efetivos *in vitro*, não protegerem o indivíduo que os produz. Isso ocorre porque os HIVs ficam escondidos do sistema imune em linfócitos, macrófagos e outros reservatórios, ou porque o driblam pela grande variabilidade da gp120. Apesar disso, tentativas de desenvolvimento de vacinas estão sendo feitas e ensaios clínicos para várias formulações estão em progresso. Lembramos que para essas vacinas serem efetivas, a ativação tanto da resposta imune celular como da humoral são importantes. As propostas de vacinas com resultados positivos em modelos animais têm sido: glicoproteínas purificadas (vacinas de subunidade cujo primeiro teste foi em 1987), vírus inativado ou atenuado (praticamente inviáveis devido ao risco), vetores virais recombinantes expressando as proteínas do HIV, ou vacinas de DNA.

Recentemente, um ensaio clínico em humanos onde eram administrados vetores adenovirais (Merck), expressando diversos antígenos de HIV foi interrompido. A análise dos indivíduos vacinados revelou que a vacina não foi capaz de proteger da infecção pelo HIV, apesar dos bons resultados obtidos em chimpanzés. Análises posteriores mostraram a possibilidade de que em indivíduos com imunidade pré-existente contra o vetor vacinal (adenovírus) a vacina tenha aumentado a susceptibilidade à infecção pelo HIV.

Para quem se interessar em estratégias e resultados atuais no desenvolvimento de vacinas contra o HIV, recomendo a revisão: New concepts in HIV-1 vaccine development, Stephenson et al, Current Opinion in Immunology 2016, 41:39–46.