

Raquel Mesquita Gonçalves

Mecanismos de entrada de vírus nas células e suas implicações terapêuticas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2015

Raquel Mesquita Gonçalves

Mecanismos de entrada de vírus nas células e suas implicações terapêuticas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2015

Raquel Mesquita Gonçalves

Mecanismos de entrada de vírus nas células e suas implicações terapêuticas

Atesto a originalidade do trabalho:

(Raquel Mesquita Gonçalves)

Orientador:

Professor Doutor Rui Medeiros

Projeto de Pós Graduação/Dissertação apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que dependem do hospedeiro para que a sua replicação e infecção ocorram. Estes podem ser classificados de acordo com as suas características físicas e bioquímicas, tais como o tamanho, morfologia, genoma e tipo de replicação. Na presente monografia, são apresentados vários mecanismos de entrada viral, bem como exemplos de vírus que usam estes mecanismos, as patologias associadas a estes e estratégias terapêuticas direcionadas para a infecção dos mesmos.

Serão abordados os mecanismos de Fusão, Macropinocitose, *Lipid Rafts*, Endocitose mediada por Caveolina e por Clatrina e a entrada viral através dos Exossomas. Para cada mecanismo viral, a título representativo, serão abordados os vírus Influenza, HIV, Semliki Forest Virus, Epstein-Barr, Papiloma Vírus Humano, Vírus Símio 40 e Vírus da Hepatite C, apresentando para cada um deles terapias atuais e emergentes.

Palavras-chave: vírus, entrada viral, infecção viral, parasitas intracelulares, fusão, endocitose

Abstract

Viruses are obligate intracellular parasites that depend on the host cell so that their replication and infection occur. These can be classified according to their physical and biochemical characteristics such as size, morphology, genome and replication type.

This monograph lists various viral entry mechanisms as well as examples of viruses that use these mechanisms, the pathologies associated and therapeutic strategies directed to infection thereof.

The fusion mechanisms will be addressed as well as macropinocytosis, lipid rafts, endocytosis mediated by caveolin and clathrin and viral entry through exosomes. For each viral mechanism, will be discussed a few viruses like Influenza Virus, HIV, Semliki Forest Virus , Epstein- Barr, Human Papillomavirus , Simian Virus 40 and Hepatitis C Virus , presenting for each one, current and emerging therapies .

Keywords: virus, viral entry, viral infection, intracellular parasites, fusion, endocytosis

Agradecimentos

Dirijo desde já um forte agradecimento ao meu orientador Professor Doutor Rui Medeiros pelo apoio, atenção, disponibilidade, compreensão e simpatia proporcionados ao longo da elaboração da minha monografia.

À Universidade Fernando Pessoa e ao seu corpo docente por me terem proporcionado 5 anos de aprendizagem e ensinamentos que levarei para a vida.

À minha Avó pelo seu esforço e dedicação porque sem ela este meu sonho não seria possível.

Agradeço ao meu Avô, Mãe, Bia, Soraia, o apoio constante e por nunca terem desistido de mim.

Ao meu Hugo, por estar comigo nos momentos bons e menos bons e por me apoiar sempre.

Aos melhores amigos que o Porto me poderia ter dado: Carolina Martins, Carolina Tavares, Cláudia Duarte, Ivo e Joana. Agradeço do fundo do coração estes 5 anos de muito estudo, brincadeira, entreatajuda e muita amizade. Levo todos no coração.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
I. Introdução	1
II. Mecanismos de entrada dos vírus nas células	3
2.1 Fusão	3
2.1.1. Proteínas de fusão classe I	6
2.1.2. Proteínas de fusão classe II	7
2.1.3. Proteínas de fusão classe III	8
2.2 Endocitose	11
2.2.1. Macropinocitose	12
2.2.2. “ <i>Lipid rafts</i> ”	14
2.2.3. Dependente de Caveolina	16
2.2.4 Dependente de Clatrina	18
2.3. Exossomas	20
3. Vírus, Terapias Atuais e Estratégias Terapêuticas relacionadas com os mecanismos de entrada virais	23
3.1 Influenza	23
3.1.1Terapêuticas Influenza	24
3.2 HIV	26
3.2.1Terapêuticas	27
3.3 Semliki Forest Virus	30
3.3.1 Terapêuticas	30

3.3.2 Aplicações terapêuticas do SFV	31
3.4 Vírus Epstein Barr	32
3.4.1 Terapêuticas	33
3.5 Vírus HPV	35
3.5.1 Terapêuticas	37
3.6 Vírus Símio 40	40
3.6.1 Terapêuticas	41
3.7 Vírus da Hepatite C	43
3.7.1 Terapêuticas	44
4. Conclusão	45
5. Referências bibliográficas	47

Índice de Figuras

Figura 1: Ilustração dos mecanismos de entrada de vírus com envelope. Adaptado de (Carter e Saunders, 2007).....	3
Figura 2: Representação dos diferentes tipos de classes de proteínas de fusão (I,II e III). I – Proteína gp41 do vírus HIV; II- Proteína E dos Flavivírus; III- Proteína G do VSV. Adaptado de (Weissenhorn <i>et al.</i> , 2007).....	4
Figura 3: Entrada de vírus por fusão dependente e independente de pH. Adaptado de (Carter e Saunders, 2007).....	5
Figura 4: Ligação da Hemaglutinina ao recetor de ácido siálico. Adaptado de (Salomon e Webster, 2009).....	6
Figura 5: Exemplo de proteína de fusão do Semliki Forest Virus. Adaptado de (Kielian, 2006).	8
Figura 6: Vários mecanismos de Endocitose utilizados pelos vírus. Adaptado de (Marsh e Helenius, 2006).	11
Figura 7: Imagem ilustrativa do processo de Macropinocitose. Adaptado de (Mercer e Helenius, 2012).....	13
Figura 8: Imagem esquemática da constituição dos <i>Lipid Rafts</i> . Adaptado de (Suzuki e Suzuki, 2006).....	14
Figura 9: Internalização do vírus SV40 mediada pela Caveolina. 1: Ligação e internalização do vírus através das Caveolas que se encontram ligadas aos filamentos de actina. 2: No interior da Caveola, os viriões induzem uma transdução de sinal que leva a uma cascata de fosforilações e despolimerizações do citoesqueleto de actina. 3: Os monómeros de actina são direccionados para a Caveola. 4: A Dinamina é recrutada para a Caveola induzindo a polimerização dos filamentos de actina. 5: A vesícula de Caveola é lançada da membrana celular e é transportada pelo citosol. 6: Após internalização, o	

esqueleto de actina retorna ao seu padrão normal. Adaptado de (Pelkmans e Helenius, 2003).	17
Figura 10: Microscopia eletrônica da Endocitose mediada por Clatrina do vírus HAdv. Adaptado de (Thorley <i>et al.</i> , 2010).....	19
Figura 11: O tamanho relativo dos Exossomas. Adaptado de (Tan <i>et al.</i> , 2013).....	20
Figura 12: Papel dos Exossomas em diferentes tecidos e o seu uso em diferentes patologias. Adaptado de (De Toro <i>et al.</i> , 2015).	22
Figura 13: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores da fusão do vírus Influenza. Adaptado de (Lee e Yen, 2012; Chen <i>et al.</i> , 2013).	25
Figura 14: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores da fusão do vírus SFV. Adaptado de (Mathiot <i>et al.</i> , 1990; Boere <i>et al.</i> , 1985; Liu e Kielian, 2012).	31
Figura 15: Representação esquemática das aplicações de partículas recombinantes de SFV. Adaptado de (Lundstrom <i>et al.</i> , 2001).	31
Figura 16: Ciclo lítico e de latência do vírus Epstein Barr. Adaptado de (Odumade <i>et al.</i> , 2011).	32
Figura 17: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores da fusão do vírus EBV. Adaptado de (Kirschner <i>et al.</i> , 2007; Odumade <i>et al.</i> , 2011).....	34
Figura 18: Possíveis terapêuticas para o EBV ao inibir o processo de entrada viral. Adaptado de (Khalil <i>et al.</i> , 2006).	39
Figura 19: Estratégias para a inibição da infecção por SV40. Adaptado de (Anderson <i>et al.</i> , 1996; Stang <i>et al.</i> , 1997; Pelkmans, 2005; Khalil <i>et al.</i> , 2006; Marsh e Helenius, 2006; Meertens <i>et al.</i> , 2006).	42
Figura 20: Patologias causadas pelo HCV. Adaptado de (Abonyi e Lakatos, 2005). ...	43

Figura 21: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores do vírus HCV. Adaptado de (Taylor *et al.*, 2000; Abonyi e Lakatos, 2005; Rejman *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Kieffer *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2011). 44

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características das proteínas de fusão. Adaptado (Allison *et al.*, 1995; Kielian, 2006; Backovic e Jardetzky, 2009 ; Zaraket *et al.*, 2013)..... 10

Tabela 2: Tipos de infecções por HPV. Adaptado de (Doorbar *et al.*, 2015)..... 36

Abreviaturas

µm: Micrómetros

ALT: Alanina aminotransferase

CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia

CTL: Linfócitos T Citotóxicos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DST: Doenças Sexualmente Transmissíveis

EBV: Vírus Epstein-Barr

Env: Proteínas de envelope

gp41: Glicoproteína 41

gp120: Glicoproteína 120

H5N1: Vírus Influenza A subtipo H5N1

HA: Hemaglutinina

HAdV: Espécie C de Adenovírus Humano

HCV: Vírus da Hepatite C

HHV-4: Vírus Herpes Humano 4

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV: Papiloma Vírus Humano

HPV-16: Papiloma Vírus Humano 16

HSPG: Proteoglicanos heparanosulfatos

HSV-1: Vírus Herpes Simplex 1

KJ: Quilojoule

KSHV: Sarcoma de Kaposi associado ao Herpes Vírus

MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade

miRNA: MicroRNA

mRNA: RNA mensageiro

nm: Nanômetros

PS: Fosfatidilserina

RNA: Ácido ribonucleico

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave; Pneumonia Atípica

SFV: Vírus Semliki Forest

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV: Vírus da Imunodeficiência Símia

SV40: Vírus Símio 40

TBEV: Vírus da Encefalite Transmitida pela Carraça

VSV: Vírus da Estomatite Vesicular

VV EV: Vírus Vaccinia com Envelope

I. Introdução

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e dependem desta condição para que a sua replicação genômica e consequências patogênicas ocorram (Marsh e Helenius, 2006). Ao longo da sua vida, os vírus deparam-se com a membrana fisiológica tanto na entrada da célula (por Fusão ou Endocitose) como na saída desta (por Gemulação ou Ruptura da membrana celular) (Chazal e Gerlier, 2003).

As principais etapas para que um vírus consiga ultrapassar esta barreira fisiológica e produzir uma infecção viral dentro da célula hospedeira, são a ligação/adsorção do virião à célula, penetração ou entrada do virião na célula, *uncoating*, transcrição do genoma viral em mRNA, tradução de mRNA viral em proteínas virais, montagem do genoma em viriões e libertação dos viriões de dentro da célula (Carter e Saunders, 2007).

Os recetores virais são moléculas específicas que se encontram à superfície da célula hospedeira (Luria *et al.*, 1978). São responsáveis por ligações muito específicas (modelo chave-fechadura). A presença de certos recetores determina em larga escala quais são os tipos de células e quais as espécies que podem ser infetadas. Alguns vírus têm de se ligar a um segundo tipo de recetor (coreceptor) para que a infecção viral ocorra, como é o caso do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Os vírus que sofrem mutações frequentemente são capazes de mudar de recetores ou de se adaptar para usar recetores alternativos, como acontece no caso do vírus H5N1 na epidemia de gripe aviária (Carter e Saunders, 2007).

As forças de ligação entre vírus e recetores são de baixa afinidade. No entanto se a partícula viral se ligar a vários recetores, esta ligação pode tornar-se irreversível. Os principais tipos de ligação são as de hidrogénio, iónicas e *Van der Waals* (Carter e Saunders, 2007).

Os mecanismos de entrada viral usados pelos vírus diferem significativamente devido às suas diferenças biofísicas impostas pelo envelope viral, contudo os mesmos vírus podem usar maneiras diferentes de entrar nas células (Thorley *et al.*, 2010). Os vírus sem

envelope penetram diretamente na membrana por lise ou pela formação de um poro (Marsh e Helenius, 2006). Os vírus com envelope utilizam o processo de fusão ou Endocitose seguida de Fusão do compartimento endossomal (Markosyan e Cohen, 2013). Há vários tipos de mecanismos de Endocitose: dependente de Clatrina, dependente de Caveolina, Macropinocitose (Flint *et al.*, 2008) e “*Lipid Rafts*” (Parton e Richards, 2003).

Cada vírus tem envolvida uma glicoproteína especializada, responsável pela fusão na membrana. A proximidade entre as duas membranas é mediada por interações de proteínas virais que ligam a recetores celulares. Este processo não é completamente entendido, mas pensa-se que resulta da formação de um poro de fusão que permite a troca de material genético (Flint *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de entrada de vírus nas células que ainda não é totalmente compreendido é sob a forma de Exossomas. Os Exossomas são nano estruturas com diâmetro compreendido entre os 30-200 nm e são libertados em vários fluidos corporais, como o sangue, urina, leite e saliva. São importantes no transporte de proteínas, mRNA, retrovírus e príões dentro de macrófagos e são produzidos em grande escala pelas células tronco neurais ou nervosas (Sims *et al.*, 2014).

As principais classes de inibidores virais são os anticorpos “neutralizantes”, as proteínas solúveis, péptidos, pequenas moléculas inibidoras e ligandos naturais (Luria *et al.*, 1978) e as principais estratégias terapêuticas passam pela uso destas propriedades para impedir a entrada viral e consequentemente, a infeção e a sua patogenicidade (Vanderlinden e Naesens, 2013).

II. Mecanismos de entrada dos vírus nas células

2.1 Fusão

Os vírus com envelope adquirem uma bicamada lipídica quando atravessam a membrana plasmática ou quando atravessam a membrana do retículo endoplasmático durante a montagem do virião (Modis, 2013).

Há dois processos pelos quais os vírus com envelope podem infectar uma célula: pela Fusão do virião com a membrana plasmática ou pela Endocitose seguida de fusão do virião com a membrana do endossoma. Ambos os processos envolvem a fusão do vírus com a membrana celular, tanto na membrana plasmática como na membrana da vesícula endossomal (Carter e Saunders, 2007). Vírus como o HIV e o Vírus Sincilial Respiratório Humano usam o primeiro método enquanto que o Influenza utiliza o segundo (Eckert e Kim, 2001).

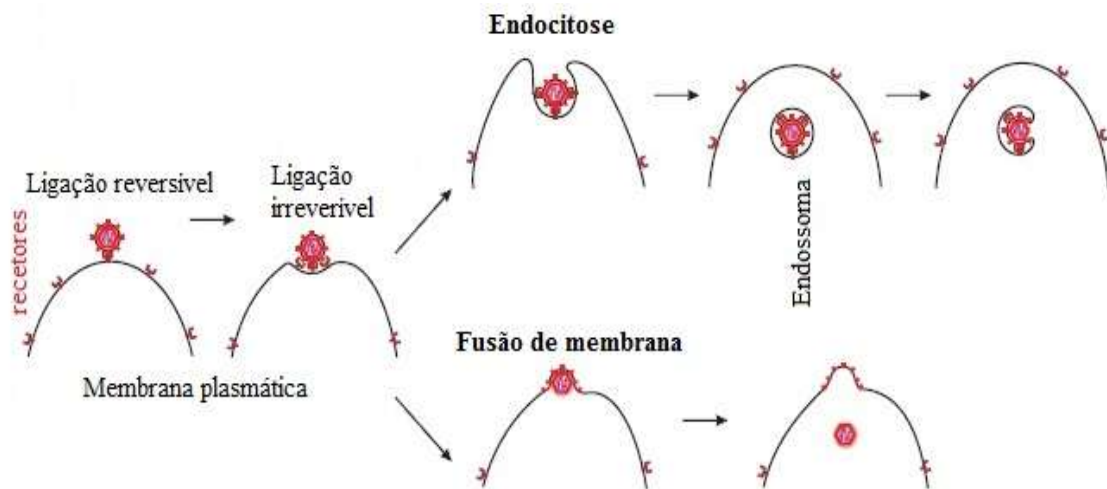


Figura 1: Ilustração dos mecanismos de entrada de vírus com envelope. Adaptado de (Carter e Saunders, 2007).

O processo de fusão requer um nível de energia na ordem dos 100 kJ mol^{-1} e não ocorre de uma maneira espontânea: cada vírus com envelope tem uma glicoproteína especializada responsável pela sua fusão (Modis, 2013).

Foram identificadas três tipos de classes de proteínas de fusão de membrana viral com base nas principais características estruturais de cada uma (Backovic e Jardetzky, 2009).

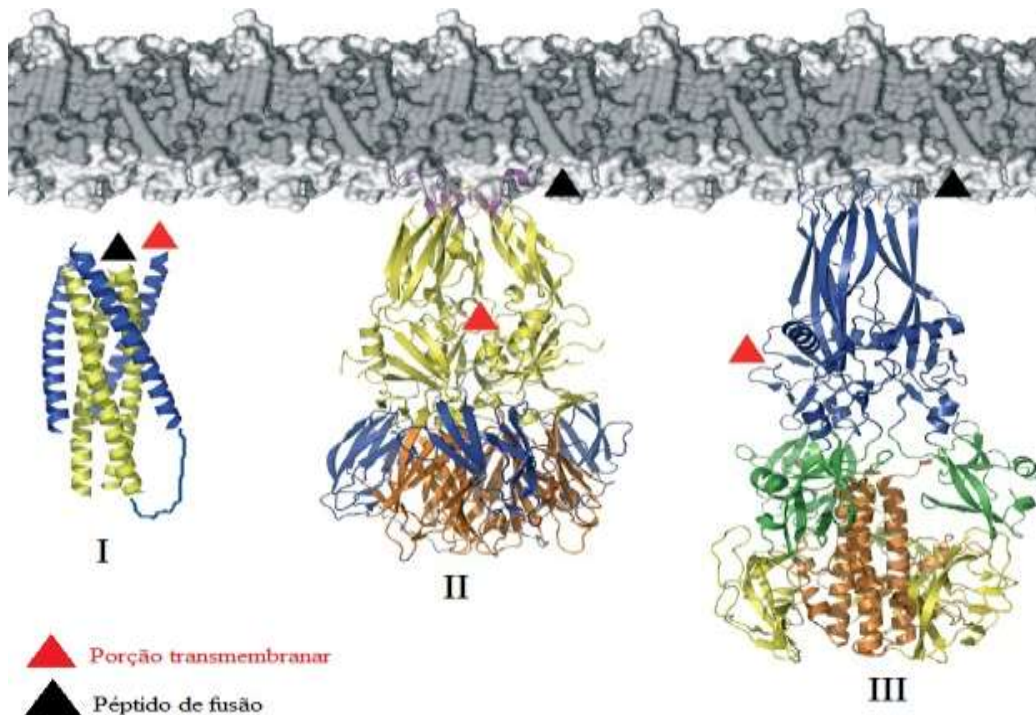


Figura 2: Representação dos diferentes tipos de classes de proteínas de fusão (I,II e III). I – Proteína gp41 do vírus HIV; II- Proteína E dos Flavivírus; III- Proteína G do VSV. Adaptado de (Weissenhorn *et al.*, 2007).

Estas proteínas são sintetizadas a partir de uma proteína que sofre clivagem e que se mantém unidas por ligações não covalentes ou por ligações dissulfídicas. As proteínas são constituídas por monómeros com pelo menos duas sequências hidrofóbicas: uma sequência transmembranar e uma sequência de fusão. Esta última só é exposta quando o processo de fusão ocorre. Isto acontece devido a uma mudança conformacional na proteína de fusão, expondo a sequência de fusão, quando o virião se liga ao recetor ou quando é induzida pelo pH ácido dentro do endossoma. Quando a sequência de fusão se encontra exposta e o virião se encontra à superfície celular, então a entrada viral pode ocorrer por fusão. Se a sequência de fusão requer um ambiente com pH baixo, então a Endocitose é a única opção. Há duas categorias de fusão de membrana: fusão independente de pH (como por exemplo os Herpesvírus e HIV) e fusão desencadeada por um pH ácido (como acontece com o vírus Influenza e Rabdovírus). Para que as duas membranas se unam e se inicie o processo de fusão, é necessária outra alteração

conformacional que envolve uma libertação de energia a partir da proteína de fusão e que irreversivelmente muda de forma (Carter e Saunders, 2007).

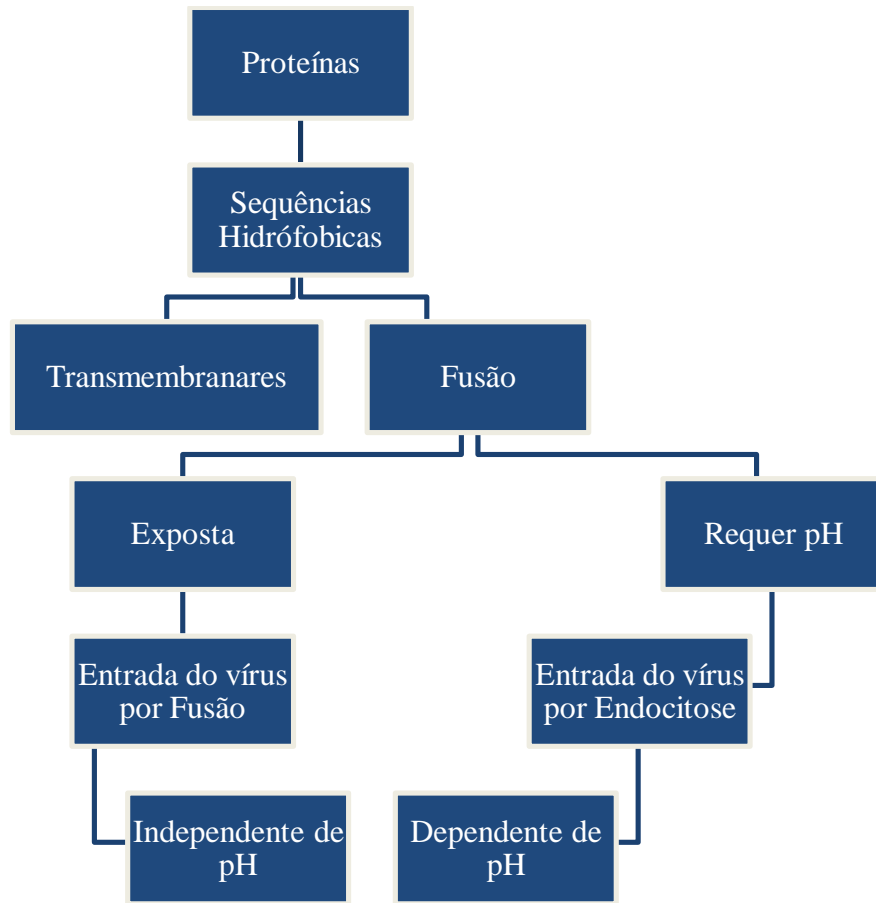


Figura 3: Entrada de vírus por fusão dependente e independente de pH. Adaptado de (Carter e Saunders, 2007).

2.1.1. Proteínas de fusão classe I

As proteínas de fusão de classe I têm características estruturais que se assemelham à Hemaglutinina (HA), proteína do Vírus Influenza, cuja estrutura foi determinada em 1981 (Backovic e Jardetzky, 2009).

Estas proteínas são caracterizadas pelos seus trímeros em forma de *hairpin* ou gancho de cabelo, contendo uma α -hélice central em forma de espiral (Weissenhorn *et al.*, 2007) e podem fundir dentro de endossomas ou diretamente na membrana plasmática (Markosyan e Cohen, 2013).

Os Ortomixovírus, Retrovírus, Paramixovírus e Filovírus são alguns exemplos representativos deste tipo de proteínas. (Stiasny *et al.*, 2002).

O vírus Influenza A é um vírus RNA de cadeia simples de sentido negativo pertencente à família *Orthomyxoviridae*. Sendo um vírus RNA de genoma segmentado, é caracterizado pela sua alta taxa de mutação e na habilidade de recombinar o seu genoma com outros vírus. Estas duas propriedades permitem que o vírus Influenza evolua constantemente, que se adapte a novos hospedeiros (Zaraket *et al.*, 2013) e contribuem para a grande diversidade que existe entre os vírus Influenza A assim como a sua propensão para infectar uma ampla variedade de hospedeiros (Carter e Saunders, 2007).

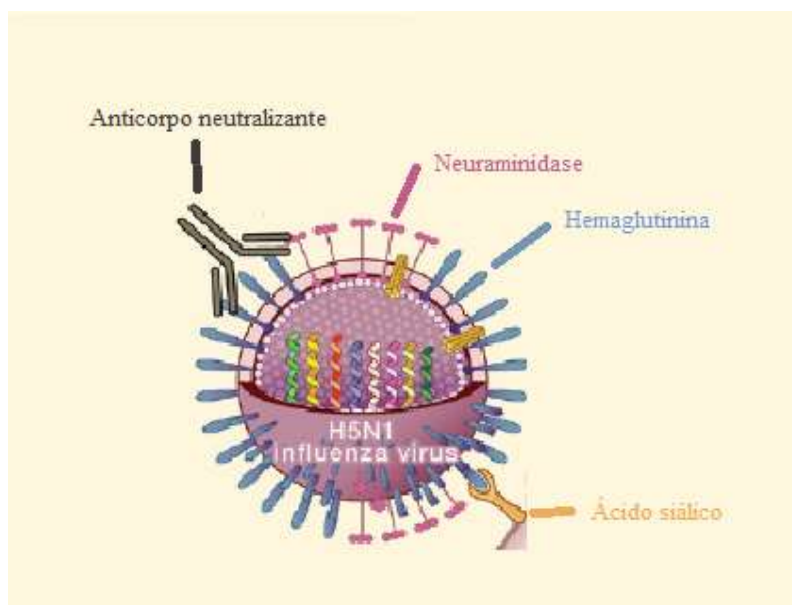


Figura 4 Ligação da Hemaglutinina ao receptor de ácido siálico. Adaptado de (Salomon e Webster, 2009).

A Hemaglutinina sofre glicosilação e é clivada em subunidades HA1 e HA2 (Zaraket *et al.*, 2013). A subunidade HA1 liga-se ao ácido siálico que se encontra à superfície da célula, permitindo que o vírus entre pela via endossomal (White *et al.*, 2008). Por outro lado a subunidade HA2 compreende a maior parte do domínio fusogênico (Zaraket *et al.*, 2013) e é constituída por duas regiões hidrofóbicas importantes para a fusão completa dos vírus com as membranas celulares (Luria *et al.*, 1978). O pH ácido no interior dos endossomas leva a mudanças conformacionais irreversíveis na proteína HA, mediando a fusão entre o vírus e a membrana endossomal (Zaraket *et al.*, 2013).

Outros tipos de proteínas de fusão de classe I são a proteína F dos Paramyxovírus e as proteínas gp120 e gp41 do Vírus da Imunodeficiência Humana (White *et al.*, 2008), ambas responsável pela fusão entre as membranas virais e as membranas celulares (Li *et al.*, 2006).

2.1.2. Proteínas de fusão classe II

As proteínas de fusão classe II são geneticamente e estruturalmente diferentes das proteínas de fusão classe I (Modis, 2013). Estas proteínas são constituídas por trímeros de *hairpins* constituídos por folhas β . Estas proteínas formam homo ou heterodímeros e não sofrem clivagem proteolítica, no entanto é necessário que haja clivagem das proteínas de membrana que estejam associadas às proteínas de fusão. Quando a proteína é exposta a um pH baixo, esta muda a sua conformação, expondo o péptido de fusão e catalisando a fusão das membranas (Weissenhorn *et al.*, 2007). Este tipo de proteínas estão associadas a uma proteína denominada chaperona (p62 para SFV E1 e prM para TBEV E) (White *et al.*, 2008).

Os Alfavírus (SFV) e os Flavivírus (TBEV E) são membros da família *Togaviridae* e *Flaviviridae* (Carter e Saunders, 2007). Estes pequenos vírus RNA com envelope, de sentido positivo, são compostos por uma cápside que é constituída pela nucleocápside (onde está presente o RNA) e uma bicamada lipídica (que contém as proteínas transmembranares virais). As estruturas destas proteínas são muito diferentes da estrutura da Hemaglutinina, sendo por isso as proteínas de fusão E1 dos Alfavírus e a E dos Flavivírus classificadas como proteínas de fusão classe II (Kielian, 2006).

A proteína E é constituída por três domínios em folhas β (White *et al.*, 2008). O domínio I é constituído por uma extremidade N-terminal, o domínio II contém uma região de dimerização e o péptido de fusão, e o domínio III é composto pelos sítios de ligação ao recetor (Kielian, 2006).



Figura 5: Exemplo de proteína de fusão do Semliki Forest Virus. Adaptado de (Kielian, 2006).

Após a exposição a um pH baixo, a proteína E sofre uma reorganização estrutural necessária para a aquisição da conformação fusogénica (White *et al.*, 2008) expondo assim o péptido de fusão dando origem ao processo de fusão (Allison *et al.*, 1995).

A proteína E1 pertencente aos Alfavírus é sintetizada e forçada a mudar a sua conformação pela proteína reguladora p62 ou PE2. Imediatamente após a sua inserção no retículo endoplasmático, as proteínas E1 e PE62 sofrem dimerização. Esta ação promove a conformação correta e o transporte das proteínas de fusão para a membrana plasmática (Kielian, 2006).

2.1.3. Proteínas de fusão classe III

A terceira classe de proteínas de fusão viral combina as características das duas anteriores (Weissenhorn *et al.*, 2007). Assim, nas proteínas de classe III está-se na presença de cinco domínios, ambos compostos por estruturas secundárias α e β e também se encontra uma

α -hélice alongada, posicionada no centro que forma uma espiral enrolada sobre si mesma (Backovic e Jardetzky, 2009).

Até ao momento foram identificadas como proteínas de fusão classe III as seguintes proteínas: glicoproteína B (gB) do Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) e do Vírus Epstein-Barr (EBV), proteína G do VSV (Vírus da Estomatite Vesicular) e a glicoproteína gp64 do Baculovirus (Backovic e Jardetzky, 2009).

O vírus EBV requer como glicoproteínas específicas a gp350, gp42 e as gH, gL e gB para a sua entrada nos linfócitos B (Kirschner *et al.*, 2007).

Quando exposta a um meio ácido, a proteína G sofre uma série de mudanças conformacionais que posiciona os “*loops*” de fusão perto da membrana alvo. Uma segunda série de mudanças conformacionais faz com que a porção C-terminal se ligue anti paralelamente, à porção N-terminal, juntando assim a membrana alvo e a membrana viral (White *et al.*, 2008).

A proteína G do VSV é caracterizada pelo facto das suas mudanças conformacionais induzidas pelo pH baixo serem reversíveis. Ou seja, os seus estados de pré-fusão e de pós-fusão estão em equilíbrio termodinâmico. A maior parte das outras proteínas de fusão virais são metastáveis e inativas (White *et al.*, 2008).

Tanto as proteínas de fusão de classe II como as proteínas de fusão de classe III iniciam o seu processo de infeção pela fusão do vírus dentro dos endossomas (Markosyan e Cohen, 2013).

Tabela 1: Características das proteínas de fusão. Adaptado (Allison *et al.*, 1995; Kielian, 2006; Backovic e Jardetzky, 2009 ; Zaraket *et al.*, 2013).

Proteínas de fusão			
Características	Classe I	Classe II	Classe III
Exemplos	Ortomixovírus Retrovírus Filovírus Paramixovírus	Alfavírus Flavivírus	HSV-1 EBV VSV Baculovirus
Estrutura	α -hélice	Folhas- β	Região central constituída por α -hélice e exterior constituído por folhas- β alongadas
Conformação pré-fusão	Proteína percursora que após sofrer clivagem proteolítica dá origem a duas subunidades que permanecem ligadas entre si por ligações não covalentes	Clivagem de proteínas de membrana que estão relacionadas com os péptidos de fusão	Os trímeros pré-fusão formam uns picos que se assemelham a um tripé. De seguida os <i>loops</i> de fusão posicionam-se na membrana viral.
Processo de entrada	Após ligação ao recetor celular ou a exposição a pH ácido, a proteína de fusão sofre uma mudança conformacional e o péptido de fusão é inserido na membrana	Após exposição a pH ácido, a proteína é reorganizada em trímeros perpendiculares à membrana viral fazendo com que o péptido de fusão fique exposto e dando início ao processo de fusão	Após exposição a um meio ácido, a proteína sofre uma série de mudanças conformacionais que posiciona os <i>loops</i> de fusão perto da membrana alvo
Conformação pós-fusão	Irreversível	Irreversível	Reversível

2.2 Endocitose

Por mecanismo de Endocitose entende-se a invaginação e compressão de pequenas regiões da membrana plasmática, resultando na internalização não específica de moléculas ou da captação específica destas, através de recetores localizados na superfície celular (Flint *et al.*, 2008).

O mecanismo de Endocitose é muito utilizado pelos vírus pois oferece muitas vantagens, tais como o ultrapassar de barreiras (como o córtex de membrana) aquando do transporte dos vírus dentro das vesículas endossomais, o facto de haver uma dependência de pH ácido faz com que o vírus se desloque para o citoplasma em locais específicos e ao utilizar a Endocitose, os componentes virais não permanecem na superfície da célula após a sua penetração, escapando assim à deteção destes por parte do sistema imunológico do hospedeiro (Marsh e Helenius, 2006).

Os vírus pertencentes às famílias *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Alfaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Arenaviridae* são exemplos de vírus que usam a Endocitose para a sua entrada na célula. Após a Endocitose, estes vão fundir com os chamados endossomas primários (como acontece no SFV) ou secundários (por exemplo no vírus Influenza), dependendo do pH que induza as suas mudanças conformacionais (White *et al.*, 2008). O lúmen dos endossomas primários tem um pH compreendido entre os 6.5 e os 6.0 que resulta do transporte de prótons para o interior dos endossomas. Já nos endossomas tardios ou secundários, o pH ronda os 6.0-5.5 (Flint *et al.*, 2008).

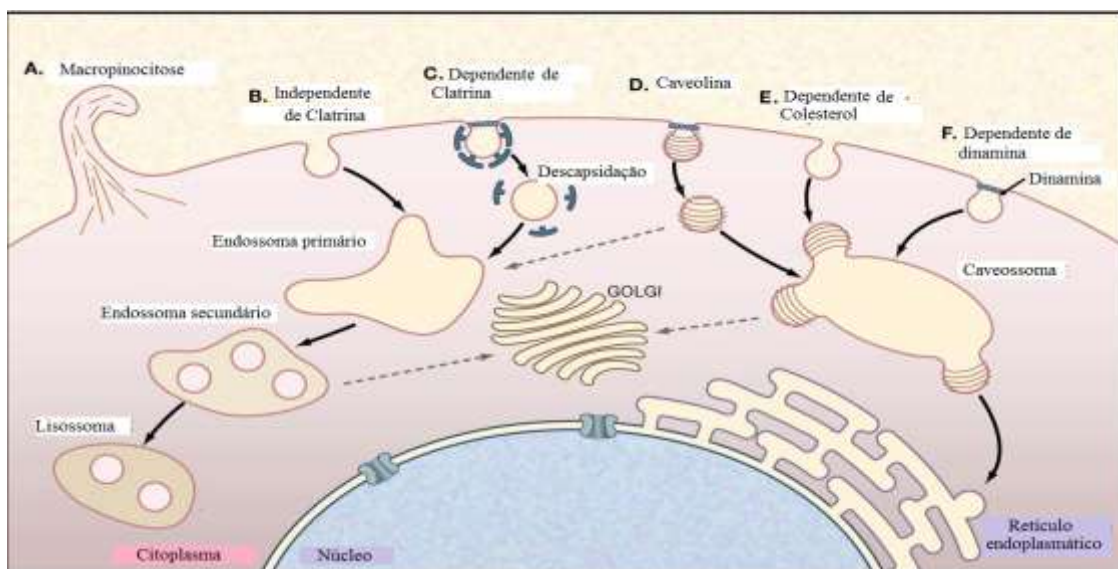


Figura 6: Vários mecanismos de Endocitose utilizados pelos vírus. Adaptado de (Marsh e Helenius, 2006).

2.2.1. Macropinocitose

A Macropinocitose é um mecanismo induzido pelo vírus para a absorção de fluidos e solutos, que tem surgido nos últimos anos como um dos principais mecanismos de infecção pelos vírus (Mercer e Helenius, 2012). Este mecanismo está envolvido na migração celular, no transporte de fluídos e de antígenos exógenos (Pernet *et al.*, 2009).

A Macropinocitose não é um processo contínuo mas sim um processo transitório, que quando é ativado, tem o seu tempo limitado. Ligandos fisiológicos como fatores de crescimento, substratos de integrina e fosfatidilserina (PS) (Pernet *et al.*, 2009) podem servir de “gatilhos” para a ativação de vias de sinalização, que são responsáveis por alterações nas células como alterações na forma, na motilidade, na dinâmica da membrana plasmática e que assim irão aumentar a taxa de Endocitose (Mercer e Helenius, 2012).

Quando a Macropinocitose é ativada, há a formação de uma superfície de células móveis (*membrane ruffling*) que quando colapsadas resultam na formação de macropinosomas (Mercer e Helenius, 2012).

Os macropinosomas são vesículas de grandes dimensões (de tamanho compreendido entre os 0,2 e os 3 μm) que aprisionam enormes quantidades de macromoléculas e fluídos. Desempenham um papel imunológico importante em células apresentadoras de antígenos, enclausurando antígenos extracelulares para posteriormente serem apresentados pelos complexos maior de histocompatibilidade (MCH-I e MHC-II) (Marechal *et al.*, 2001).

A principal vantagem deste mecanismo é o facto dos vírus não precisarem de se ligar a recetores específicos, podendo ligar-se a qualquer componente da superfície celular. Uma vez ligados, estes vírus estimulam os recetores apropriados na membrana plasmática, para que o processo de Macropinocitose tenha início (Mercer e Helenius, 2012).

O processo de Macropinocitose pode ser dividido em 5 etapas: adsorção do vírus à superfície celular, ativação da sinalização intracelular, protrusão da membrana, formação do vacúolo e transporte nos macropinosomas (Mercer e Helenius, 2012).

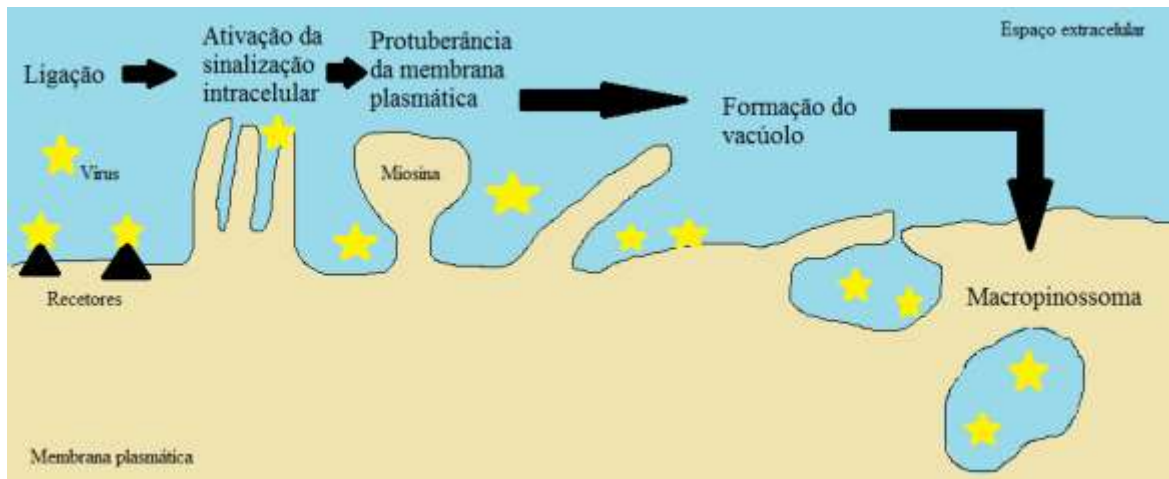


Figura 7: Imagem ilustrativa do processo de Macropinocitose. Adaptado de (Mercer e Helenius, 2012).

Os vírus que podem ser incluídos neste tipo de mecanismos de entrada viral são o Ébola, Sarcoma de Kaposi associado aos Herpes Virus (KSHV), VV EVs, Nipah, HIV-1 e HPV (Mercer e Helenius, 2012).

2.2.2. “Lipid rafts”

Os vírus, sendo parasitas intracelulares obrigatórios, são confrontados com a membrana celular durante a sua replicação viral. Usam-na como via de entrada nas células do hospedeiro por vários mecanismos de endocitose, hemifusão, permeação e também para sair das mesmas por “budding” (mecanismo usado pelos vírus com envelope) ou por ruptura de membrana (Chazal e Gerlier, 2003).

Pequenos domínios da membrana celular, chamados “*lipid rafts*” (jangadas lipídicas) têm um papel importante na replicação viral. São formados principalmente por caveolina, (Chazal e Gerlier, 2003) colesterol e glicosfingolípidos (Suzuki e Suzuki, 2006). Os “*lipid rafts*” são caracterizados pela sua pequena dimensão, mobilidade e instabilidade. Estão presentes em abundância na membrana plasmática e participam em diversos processos celulares como transdução de sinal, Endocitose e recetores celulares (Chazal e Gerlier, 2003).

São dotados de propriedades bioquímicas diferentes: parte do microdomínio dos “*lipid rafts*” é composta por cadeias de hidrocarbonetos, formando o microdomínio desordenado. A outra parte é formada por cadeias acílicas rectas de lípidos polares saturados que permite a formação de um microdomínio ordenado aprisionando moléculas de colesterol (Parton e Richards, 2003).

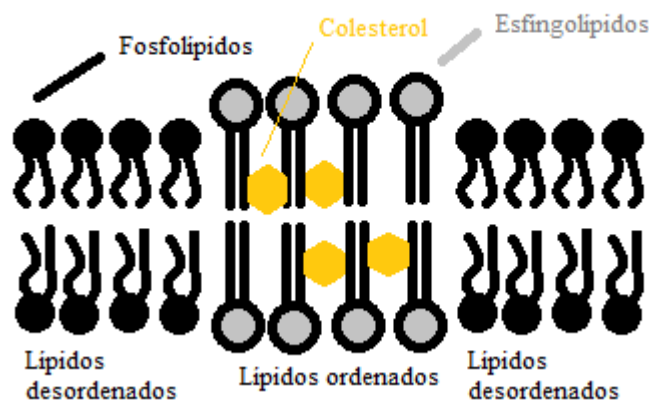


Figura 8: Imagem esquemática da constituição dos *Lipid Rafts*. Adaptado de (Suzuki e Suzuki, 2006).

Após a ligação do vírus aos receptores de membrana, as suas cápsides sofrem invaginação pela membrana plasmática ou entram nas células por vesículas intracitoplasmáticas (Chazal e Gerlier, 2003).

O Echovirus tipo 1 pertence à família *Picornaviridae* e utiliza o mecanismo de entrada viral mediado pela Caveolina para a incorporação e transporte para a região perinuclear (Chazal e Gerlier, 2003). O Rotavírus (pertencente à família *Reoviridae*), Enterovírus (pertencente à família *Picornaviridae*), Espécie C de Adenovírus Humano (HAdV) que pertence à família *Adenoviridae* e Rinovírus (pertencente à família *Picornaviridae*) são também exemplos de vírus que usam este tipo de mecanismo para entrar nas células (Suzuki e Suzuki, 2006).

O Echovirus tipo 1 inicia a sua infecção pela ligação a uma integrina ($\alpha_2\beta_1$) (Suzuki e Suzuki, 2006) que induz uma mudança conformacional na cápside viral entrando assim na célula a infectar (Chazal e Gerlier, 2003).

Os Rotavírus do Grupo A infetam as células epiteliais via vários complexos moleculares, como gangliosídeos, glicoproteínas, proteína Hsc70 (Suzuki e Suzuki, 2006) e integrinas como $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ que estão presentes nos “*lipid rafts*”, favorecendo a entrada de partículas de rotavírus (Chazal e Gerlier, 2003).

Os Rinovírus infetam as células epiteliais humanas através de plataformas ricas em ceramidas produzidas pelo ácido esfingomielinase. Este tipo de vírus induz a activação e translocação do ácido esfingomielinase para o folheto exterior da membrana celular que resulta numa reorganização de microdomínios de “*lipid rafts*” e na formação de plataformas enriquecidas em ceramida (Suzuki e Suzuki, 2006).

2.2.3. Dependente de Caveolina

As Caveolas são pequenas invaginações na membrana plasmática (Stang *et al.*, 1997), de superfície lisa, em forma de balão, com aproximadamente 55 a 65 nm de diâmetro (Parton e Richards, 2003) e são revestidas maioritariamente por caveolina, colesterol e esfingolípidos (Marechal *et al.*, 2001). São responsáveis pela internalização de macromoléculas, toxinas, vírus e bactérias (Marechal *et al.*, 2001).

As Caveolas são constituídas na maioria por uma proteína denominada VIP-21 ou Caveolina-1 que desempenha um papel importante na formação da Caveolina. A Caveolina-1 pode ser expressa em dois tipos de isoformas, a α e/ou a β . Existem também a Caveolina-2, que normalmente é co expressa com a Caveolina-1 no mesmo tipo de célula a Caveolina-3, que se encontra predominantemente nos músculos esquelético e cardíaco (Parton e Richards, 2003).

A Caveolina é encontrada nos adipócitos, nas células endoteliais e musculares mas indetetável noutros tipos, como nos linfócitos e células neuronais (Damm *et al.*, 2005).

O Vírus SV40 depende deste mecanismo para entrar na célula (Gobeil *et al.*, 2012), demonstrando ser o primeiro vírus a entrar nas células por uma via independente da Endocitose mediada por Clatrina (Thorley *et al.*, 2010).

Assim, este vírus liga-se à proteína de membrana GM1 (Engel *et al.*, 2011) e às proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (Stang *et al.*, 1997), e a sua entrada é mediada pela Caveolina (Suzuki e Suzuki, 2006). Este processo pode demorar várias horas após o início da Endocitose (Engel *et al.*, 2011).

Após a internalização do SV40 as Caveolas fundem-se com os caveossomas, sendo o vírus interiorizado nestes. Os Caveossomas são organelos com pH neutro e a sua forma assemelha-se a um balão, revestidos no interior por Caveolina-1. São estruturas estáveis, estacionárias e constituídas por colesterol (Pelkmans e Helenius, 2003) que são responsáveis pelo transporte do vírus por microtúbulos até ao retículo endoplasmático, onde se funde com organelos que o constituem (Thorley *et al.*, 2010).

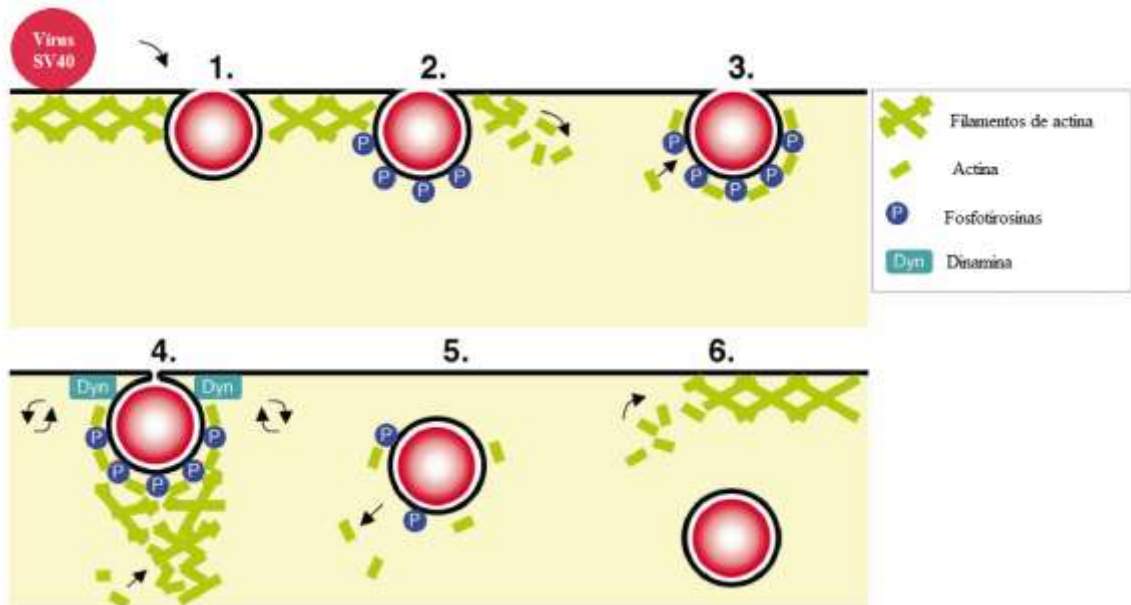


Figura 9: Internalização do vírus SV40 mediada pela Caveolina. 1: Ligação e internalização do vírus através das Caveolas que se encontram ligadas aos filamentos de actina. 2: No interior da Caveola, os viriões induzem uma transdução de sinal que leva a uma cascata de fosforilações e despolimerizações do citoesqueleto de actina. 3: Os monómeros de actina são direcionados para a Caveola. 4: A Dinamina é recrutada para a Caveola induzindo a polimerização dos filamentos de actina. 5: A vesícula de Caveola é lançada da membrana celular e é transportada pelo citosol. 6: Após internalização, o esqueleto de actina retorna ao seu padrão normal. Adaptado de (Pelkmans e Helenius, 2003).

2.2.4 Dependente de Clatrina

Os vírus que utilizam a Endocitose mediada por Clatrina para a sua entrada viral tiram partido deste mecanismo por ser uma das vias mais predominantes de internalização dos vírus (Meertens *et al.*, 2006).

Neste mecanismo de entrada, os vírus ligam-se aos seus respectivos recetores transmembranares e são agrupados em cavidades revestidas por Clatrina. Quando estas cavidades alcançam um tamanho aproximadamente de 150 nm, formam-se vesículas. A formação da vesícula endocítica resulta da junção de Clatrina com proteínas de membrana (Ungewickell e Hinrichsen, 2007). As vesículas são posteriormente fundidas com os endossomas primários (Marechal *et al.*, 2001) e secundários (Marsh e Helenius, 2006).

Este processo é contínuo, rápido e eficiente, embora complexo pois encontram-se envolvidas mais de 90 cinases diferentes responsáveis pela internalização dos vírus (como reguladores do citoesqueleto, do ciclo celular, de fatores de crescimento, e do tráfico celular) (Marsh e Helenius, 2006).

As vesículas revestidas por Clatrina têm uma morfologia em forma de barril ou de bola de futebol (Sun *et al.*, 2005). Dependendo do seu pH, a fusão do vírus na membrana das vesículas endossomais ocorre nos endossomas primários (se o pH estiver compreendido entre os 6,5 e os 6,0) ou nos endossomas secundários (se neste caso o pH estiver compreendido entre os 6,0 e os 5,5). Em alguns casos, a alteração do pH não é suficiente para induzir uma mudança conformacional nos vírus (como acontece no Ébola e SARS) e é necessária a clivagem proteolítica das proteínas virais nomeadamente pela catepsina L e B para que a fusão ocorra (Marsh e Helenius, 2006).

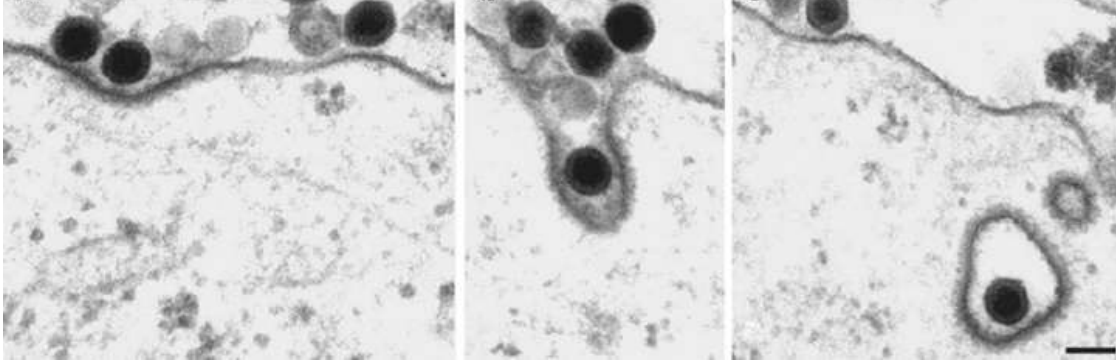


Figura 10: Microscopia eletrônica da Endocitose mediada por Clatrina do vírus HAdv. Adaptado de (Thorley *et al.*, 2010).

O vírus da hepatite C utiliza a Endocitose mediada por Clatrina para entrar na célula, o que significa que esta não ocorre na membrana plasmática mas sim dentro de um compartimento endossomal, com pH ácido (Blanchard *et al.*, 2006).

O vírus HCV entra no fígado pela veia sinusoidal e liga-se às proteínas CD81 e SR-81 localizadas na membrana basolateral dos hepatócitos. A glicoproteína E2 liga-se à CD81 e promove a entrada do vírus da hepatite C pela Endocitose mediada pela Clatrina (Thorley *et al.*, 2010) .

2.3. Exossomas

Os Exossomas podem ser considerados outro tipo de mecanismo de entrada de vírus nas células sob a forma independente de recetor (Sims *et al.*, 2014).

Estes são nano estruturas com diâmetro compreendido entre 30-200 nm (Sims *et al.*, 2014) e são libertados em diferentes fluidos corporais como sangue, urina, leite e saliva (Sims *et al.*, 2014).

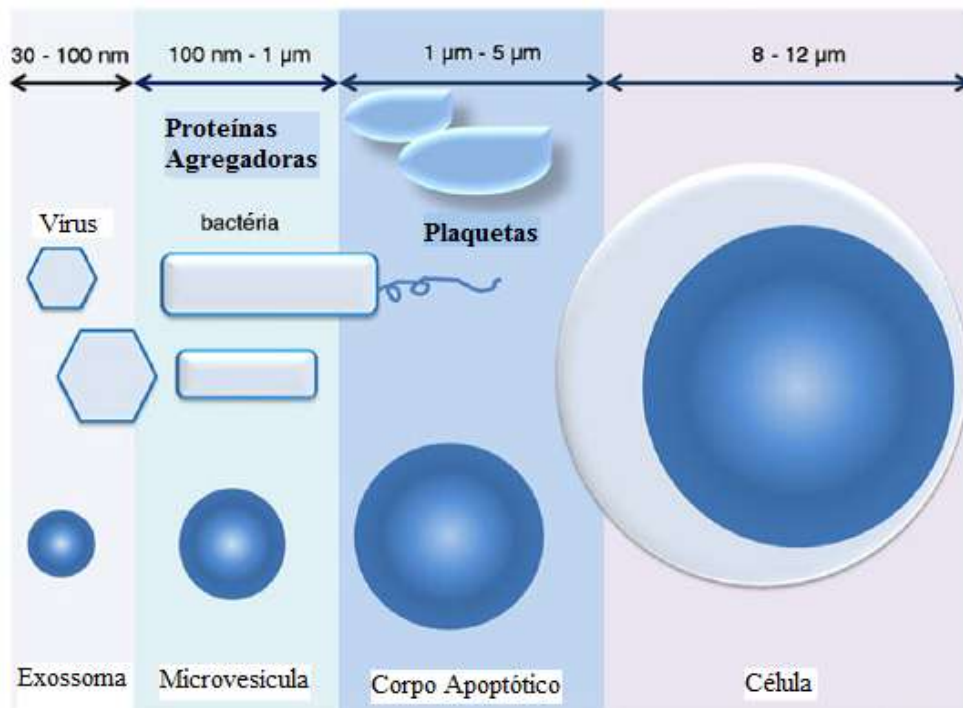


Figura 11: O tamanho relativo dos Exossomas. Adaptado de (Tan *et al.*, 2013).

Várias funções biológicas estão asseguradas pelos Exossomas, como a comunicação intercelular, transdução de sinal, transporte de material genético e modulação de respostas imunes (Tan *et al.*, 2013).

São constituídos por uma grande quantidade de lípidos (colesterol, esfingomiéline, ceramida), proteínas (tetraspaninas, Alix, TSG 101 e HSPs) e outras moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (MHC I e MHC II), transdução de sinal e na adesão às células (Tan *et al.*, 2013).

Os Exossomas têm origem nos endossomas tardios (Sun *et al.*, 2012) e formam-se através de invaginações de pequenas vesículas intralumenais com o sistema endossomal

(Christianson *et al.*, 2014). Estes são secretados pelas células através de múltiplas vesículas endossomáticas e transportam material genético, várias moléculas biológicas (proteínas, mRNA, miRNA) e ajudam a manter a homeostasia biológica (Tan *et al.*, 2013).

Esta via exossomal permite que o vírus tenha ao seu alcance uma grande variedade de células que normalmente não são um alvo natural (Sims *et al.*, 2014).

Os Exossomas são uma nova forma de transporte de fármacos que são em tudo semelhantes com as típicas nanopartículas. Tal como acontece nas nanopartículas sintetizadas *in vitro*, os Exossomas são libertados das células hospedeiras, não são citotóxicos e transportam informação para células-alvo (Sun *et al.*, 2012).

Estão também envolvidos na modulação do sistema imunitário, na regulação de funções das células neuronais e no metabolismo dos lípidos (Tan *et al.*, 2013).

Como exemplos deste tipo de mecanismo de entrada viral temos o vírus HCV (Liu *et al.*, 2014), HIV e Adenovírus 5 (Sims *et al.*, 2014).

Devido à similaridade no tamanho e composição dos Retrovírus, os Exossomas, podem atuar como uma espécie de “Cavalo de Tróia” para a entrega de pequenas moléculas dentro das células, pelo mecanismo similar de como os vírus infetam as células (Tan *et al.*, 2013).

Tanto os Exossomas como os Retrovírus contêm uma bicamada lipídica, uma película constituída por glicanos e estão enriquecidos com proteínas e material genético idêntico. Inclusive, estima-se que os Exossomas e os Retrovírus partilhem um ancestral comum, diferenciando-se apenas por uma mutação numa simples estrutura de *gag*. Os Exossomas e os Retrovírus utilizam a mesma biogénese e mecanismo de entrada viral nas células-alvo. Assim, os Exossomas estão intimamente envolvidos no transporte de miRNA viral, um potente mecanismo de infetividade e de comunicação intracelular (Tan *et al.*, 2013), podendo contribuir indiretamente para a patogénese viral (Nour e Modis, 2014).

Os Exossomas estão também associados à transmissão de proteínas de priões na doença de Creutzfeld-Jakob (Tan *et al.*, 2013) e em priões dentro de macrófagos (Sims *et al.*, 2014).

Devido ao seu tamanho nanométrico e por desempenharem um papel importante nas funções biológicas, os Exossomas são utilizados como uma nova plataforma de entrega para terapia genômica, assim como são ferramentas para diagnóstico e biomarcadores de doenças (Tan *et al.*, 2013).

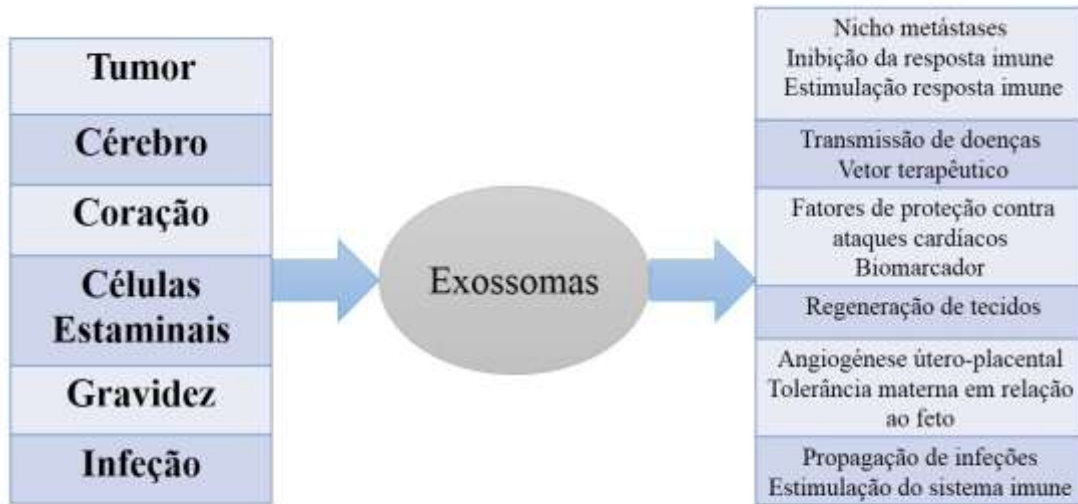


Figura 12: Papel dos Exossomas em diferentes tecidos e o seu uso em diferentes patologias. Adaptado de (De Toro *et al.*, 2015).

3. Vírus, Terapias Atuais e Estratégias Terapêuticas relacionadas com os mecanismos de entrada virais

3.1 Influenza

A Gripe é uma doença respiratória febril muito relevante, quer a nível médico quer a nível económico no mundo inteiro (Edinger *et al.*, 2015). Os agentes infecciosos responsáveis por esta patologia são o Influenza do tipo A e o Influenza do tipo B (Chen *et al.*, 2013).

Os reservatórios naturais destes serótipos são as aves aquáticas. A transmissão dá-se por duas formas: direta (como se observou na Gripe Espanhola) ou pelo rearranjo entre os genomas segmentados de RNA do vírus da gripe aviária e da gripe humana (como se deu nas Gripes Asiáticas e de Hong Kong) (Salomon e Webster, 2009).

O impacto sazonal causado por este vírus deve-se à variação antigénica das suas principais glicoproteínas virais: a Hemaglutinina e a Neuraminidase. Estas variações podem ser combatidas pelas vacinas antigenicamente combinadas e pelos fármacos antivirais (Salomon e Webster, 2009).

Contudo, a rápida evolução do vírus Influenza A continua a dificultar o uso de vacinas. Devido à sua instabilidade genómica, as vacinas podem-se tornar rapidamente desatualizadas. O intervalo de tempo entre a produção de uma vacina e os surtos de gripe (em média 6 meses ou mais) pode resultar na discrepância entre a terapêutica e o vírus (Salomon e Webster, 2009). Assim, os fármacos antivirais e as medidas não farmacológicas são aspetos críticos para o controlo do início de uma pandemia (Singh *et al.*, 2015).

Os fármacos aprovados para a terapêutica antiviral pertencem a duas classes: os Inibidores da Proteína M2 (Amantadina e Rimantadina que pertencem à classe dos Adamantanos) e os Inibidores da Neuraminidase (Oseltamivir, Zanamivir e Laninamivir). (Chen *et al.*, 2013).

3.1.1 Terapêuticas

Os inibidores da Neuraminidase são os fármacos mais prescritos para a profilaxia e para o tratamento do vírus da gripe (Salomon e Webster, 2009).

O tratamento deve ser iniciado 48 horas após os primeiros sintomas. Findo este prazo, a eficácia do tratamento diminui e aumenta a taxa de mortalidade e morbibilidade associadas ao Influenza (Nguyen *et al.*, 2012).

Os inibidores da Neuraminidase têm a vantagem de causar menos efeitos adversos ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), induzem menos estirpes resistentes e são mais eficazes em todos os subtipos de neuraminidase (Salomon e Webster, 2009).

O Zanamivir foi o primeiro fármaco a ser desenvolvido e é de uso inalatório. Com a necessidade de uma nova formulação para ser administrado via oral, surgiu o Oseltamivir que devido à sua via de administração é o mais utilizado (Lee e Yen, 2012).

Como os inibidores da Neuraminidase são análogos do ácido siálico, o mecanismo de ação destes antivirais passa pela competição com aos ligandos naturais, bloqueando os locais de ligação do vírus e inibindo o processo de fusão (Lee e Yen, 2012).

A proteína M2 é uma proteína de membrana integral que constitui o canal condutor de prótons. Este canal regula o ambiente ácido necessário para que se dê a fusão do vírus com a membrana celular do hospedeiro. Ao bloquear este canal, os inibidores da proteína M2 impedem a fusão do vírus com a membrana celular do hospedeiro (Lee e Yen, 2012).

Os derivados dos Adamantanos, Amantadina e Rimantadina, são muito eficazes no bloqueio da atividade da proteína M2 nos vírus da Influenza A, mas não demonstram qualquer tipo de inibição relativamente à proteína M2 do Influenza B (Lee e Yen, 2012).

Como há um aumento cada vez maior da resistência dos vírus aos fármacos convencionais, é urgente o desenvolvimento de novas terapêuticas (Salomon e Webster, 2009).

A Difilina é um composto natural isolado da *Cleistanthus collinus* e foi recentemente identificada como sendo um inibidor da v-ATPase (Chen *et al.*, 2013). A atividade da ATPase Vacuolar (v-ATPase) é responsável por bombear prótons para dentro do compartimento endossomal para que se dê início ao processo de fusão do vírus Influenza.

Com o bloqueio das subunidades da v-ATPase apresenta-se uma oportunidade de impedir a replicação do vírus ao inibir a fusão de membrana entre os endossomas e os viriões, que depende de um meio com pH ácido (Chen *et al.*, 2013).

A Difilina combinada com a Amantadina demonstra um aumento do efeito inibitório da fusão viral pela inibição completa da acidificação endossomal (Chen *et al.*, 2013).

Por outro lado, ao combinar Osetalmivir e Difilina, consegue-se um efeito sinérgico devido ao facto da Difilina exercer o seu poder antiviral na fusão viral e o Osetamivir ter um efeito mais tardio na replicação viral (Chen *et al.*, 2013).

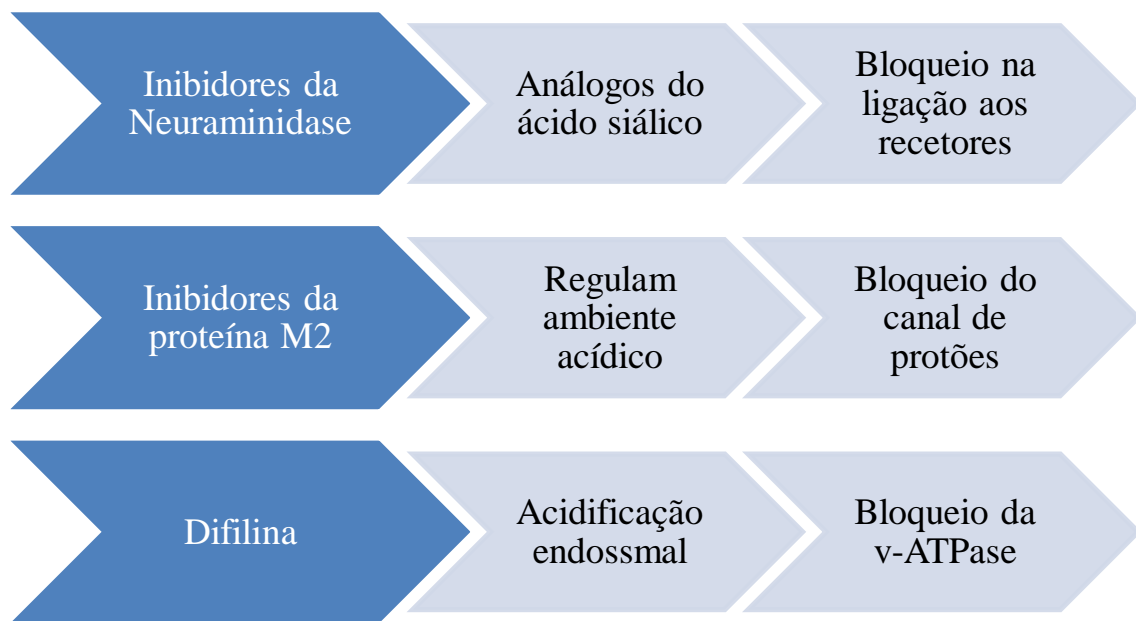


Figura 13: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores da fusão do vírus Influenza. Adaptado de (Lee e Yen, 2012; Chen *et al.*, 2013).

3.2 HIV

O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma doença infecciosa muito grave causada por um vírus denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Desde o seu aparecimento há pouco mais de 30 anos, já morreram mais de 25 milhões de pessoas em todo o mundo e hoje em dia estima-se que 33 milhões estarão infetadas (Wilén *et al.*, 2012b).

Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2. Estes tiveram origem a partir do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV). O vírus mais prevalente é o HIV-1, principal responsável pela pandemia de SIDA enquanto que a prevalência do HIV-2 é restrita ao Oeste Africano (Carter e Saunders, 2007).

Em síntese, o HIV leva a uma doença que enfraquece o sistema imunitário humano, aumentando a suscetibilidade a infeções oportunistas que normalmente não afetam indivíduos imunocompetentes. Este estágio final da doença denomina-se de SIDA (Carter e Saunders, 2007).

O vírus HIV entra nas células pelo mecanismo de fusão, tal como acontece com os vírus Influenza, Semliki ou Epstein-Barr, contudo e ao contrário destes vírus, o mecanismo de fusão viral do HIV não requer um valor de pH baixo. Isto mostra que a fusão do HIV não é restrita aos compartimentos intracelulares acídicos e que pode, portanto, ocorrer à superfície da célula ou em endossomas (Melikyan, 2014).

O envelope do vírus HIV é constituído por um complexo glicoproteico, as glicoproteínas gp120-gp41. Este complexo é responsável pela ligação do vírus à célula e consequentemente pelo processo de infeção. A gp120 tem como função a ligação do vírus à célula (que na sua maioria são linfócitos T) através do recetor CD4, enquanto que a gp41 é a responsável pelo processo de fusão entre a membrana viral e a membrana da célula hospedeira (Wilén *et al.*, 2012b; Melikyan, 2004).

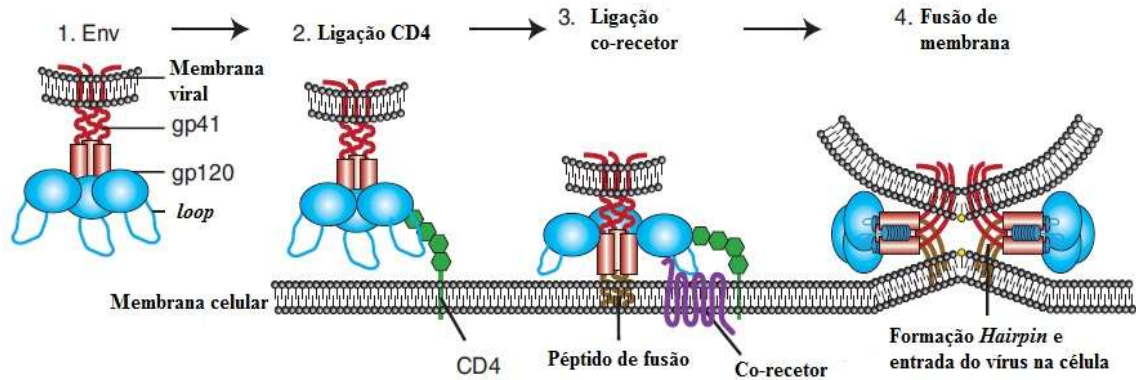


Figura 14: Mecanismo de entrada viral do HIV. Para que o processo de infecção ocorra, o vírus tem que se ligar à membrana celular pela proteína do envelope (Env), constituída pelo complexo glicoproteico gp120-gp41. Após a ligação da gp120 ao receptor CD4, a gp41 sofre alterações conformacionais e vai ligar-se ao domínio de fusão da membrana, permitindo que as membranas celulares e o invólucro viral se aproximem e se dê início à fusão viral (Wilén *et al.*, 2012a).

Indivíduos que tenham uma mutação no gene que codifique o receptor CCR5, não adquirem infecção quando são expostos ao vírus. Isto acontece devido à deleção do nucleosídeo 32 no gene CCR5. Os indivíduos que forem homozigóticos para esta mutação não expressam o receptor nas suas células e os indivíduos heterozigóticos demonstram ter uma elevada resistência à infecção viral (Carter e Saunders, 2007).

Existem vários tipos de agentes antirretrovirais usados para tratar a infecção por HIV. Estes fármacos são agrupados de acordo com a fase viral que interferem. Assim, existem os inibidores de entrada, os inibidores da transcriptase reversa, os inibidores de integração, os inibidores da transcrição, os inibidores da montagem e produção de víriões e o por fim, os inibidores da protease viral (Arts e Hazuda, 2012).

3.2.1Terapêuticas

Os mecanismos de entrada viral representam os alvos mais interessantes para a investigação e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da infecção por HIV (Briz *et al.*, 2006).

As principais etapas para que o vírus HIV consiga entrar nas células hospedeiras são a ligação da proteína viral gp120 ao recetor celular CD4 das células T, a ligação da proteína gp120 aos coreceptores CCR5 ou CXCR4 e por último, a fusão das membranas (Briz *et al.*, 2006).

Há vários compostos capazes de inibir a principal ligação dos recetores gp120-CD4. De entre os quais se destacam o PRO-542, que é uma solução de anticorpos recombinantes que mimetiza o recetor CD4; o TNX-355, um anticorpo monoclonal que compete com a glicoproteína viral gp120 pela ligação ao recetor CD4; o CADA é um inibidor específico da ligação CD4-gp120 que não atua diretamente nos recetores mas sim regula a expressão do recetor celular (Briz *et al.*, 2006) e o BMS-806 tem a capacidade de se ligar ao recetor viral gp120, bloqueando as mudanças conformacionais necessárias à fusão viral (Lin *et al.*, 2003).

Para além da ligação dos recetores principais, como já foi mencionado, é necessária uma segunda ligação ao coreceptor CCR5 ou CXCR4. Estes recetores são também inibidos pelos antagonistas do recetor CCR5 e do recetor CXCR4. A maior parte dos antagonistas do recetor CCR5 são pequenas moléculas que mimetizam ligandos naturais dos coreceptores, as quimoquinas, ligando-se a estes para que não sejam reconhecidos por proteínas virais, funcionando assim como inibidores alostéricos. Exemplos deste tipo de inibidores são o TAK-652, PRO-140, Aplaviroc e o Maravicov (Briz *et al.*, 2006; MacArthur e Novak, 2008). KRH-1636 e KRH-2731 são exemplos de antagonistas do recetor CXCR4 que interagem com as forças eletrostáticas entre o recetor e o *loop* da proteína viral (Briz *et al.*, 2006).

Após a ligação aos coreceptores, as proteínas de envelope sofrem mudanças conformacionais para que se inicie o processo de fusão. A proteína gp41 sofre uma reorganização estrutural, provocando a interação entre duas regiões (HR1 e HR2) que posteriormente irão formar uma estrutura fulcral para que se dê início à fusão entre o vírus e a célula. Nesta fase, os inibidores de fusão, e tal como o próprio nome indica, são responsáveis por inibir a fusão entre as membranas. O Enfurvirtida mimetiza um fragmento da região HR2 e ao ligar-se à região HR1 vai bloquear a formação da estrutura necessária à fusão viral (Briz *et al.*, 2006; Arts e Hazuda, 2012).



Figura 15: Inibidores de entrada do vírus HIV. Adaptado de (Briz *et al.*, 2006).

3.3 Semliki Forest Virus

O Semliki Forest Virus (SFV) é um Alfavírus pertencente à família *Togaviridae* (Fazakerley, 2002). É um vírus com envelope (Lundstrom, 2003) e de RNA de cadeia simples (Lundstrom, 2005).

Este vírus é encontrado na África subsariana onde se propaga naturalmente pelas espécies de mosquitos *Aedes africanus* e *Aedes aegypti* (Fazakerley, 2002).

Dependendo da estirpe de SFV a maioria não é agressiva para os humanos, sendo as infecções assintomáticas ou moderadas. Durante a fase aguda de infecção os sintomas são indistinguíveis dos sintomas da Malária, Influenza ou de outra doença febril sendo os mais comuns febre, cefaleias, mialgias e artralgias (Mathiot *et al.*, 1990; Fazakerley, 2002; Lundstrom, 2005).

As estirpes mais virulentas do SFV, como a L10 e a SFV4, multiplicam-se rapidamente nos neurónios e podem causar uma encefalite letal (Keogh *et al.*, 2002).

O modo de transmissão deste vírus é maioritariamente pela picada do mosquito (Mathiot *et al.*, 1990), contudo como o vírus SFV é relativamente estável em aerossóis este pode ser transmitido via inalação (Fazakerley, 2002).

3.3.1 Terapêuticas

Não existe um tratamento antiviral específico para esta infecção (Mathiot *et al.*, 1990) contudo as estratégias terapêuticas passam pelo bloqueio do seu recetor, a proteína E1 ou pela inibição das mudanças conformacionais necessárias para que o vírus se funda com as membranas celulares. Isto pode ser conseguido através do uso de anticorpos monoclonais (Boere *et al.*, 1985) ou pelo uso de zinco, responsável pela inibição da conformação do trímero pós-fusão (Liu e Kielian, 2012). A Clorpromazina também inibe a entrada do SFV por interferir com o pH necessário para a fusão viral (Meertens *et al.*, 2006).

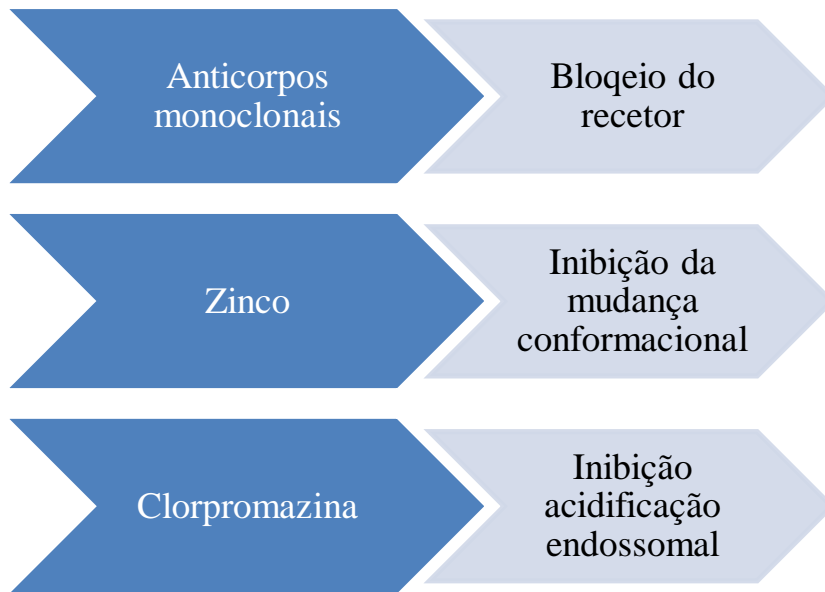


Figura 16: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores da fusão do vírus SFV. Adaptado de (Mathiot *et al.*, 1990; Boere *et al.*, 1985; Liu e Kielian, 2012).

3.3.2 Aplicações terapêuticas do SFV

As formas atenuadas do SFV podem ser usadas como vetores virais para aplicações em neurociências e na biologia molecular moderna, expressão de genes e proteínas, produção de vacinas e para terapia genética e oncológica (Keogh *et al.*, 2002; Lundstrom, 2005).

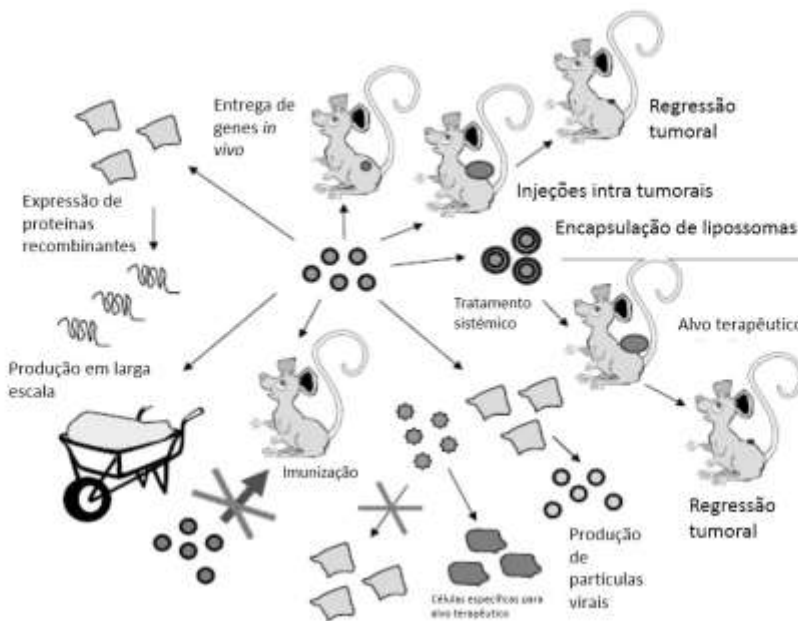


Figura 17: Representação esquemática das aplicações de partículas recombinantes de SFV. Adaptado de (Lundstrom *et al.*, 2001).

3.4 Virus Epstein Barr

O Vírus Epstein Barr (EBV) é um vírus que causa infecção persistente em mais de 90% dos adultos (Crawford *et al.*, 2002) (Cohen, 2009). Este vírus, também conhecido como herpes humano 4 (HHV-4), pertence à família *Herpesviridae* e é um vírus de DNA de cadeia dupla. Foi o primeiro vírus humano a ser diretamente implicado na carcinogênese (Grywalska *et al.*, 2013). A maior parte das pessoas que estão infetadas produzem EBV na sua saliva e a transmissão é feita por contato próximo (Crawford *et al.*, 2002). Após a exposição ao vírus, os indivíduos são portadores deste ao longo da sua vida podendo ou não ter complicações mais graves (Odumade *et al.*, 2011).

O vírus EBV está associado a patologias como o Linfoma de Burkitt, Carcinoma da Nasofaringe, Linfoma de Hodgkin e outros linfomas malignos em pacientes imunodeprimidos (Grywalska *et al.*, 2013).

Existem dois picos para a infecção por EBV: um por volta dos 6-7 anos e outro aos 14-15 anos. Este primeiro pico tem a ver com a propagação do vírus pelos membros familiares e pela partilha de brinquedos e outros utensílios (Odumade *et al.*, 2011) e o segundo pico tem a ver com a propagação por contato sexual. Quanto maior o número de parceiros sexuais, maior o risco de infecção por EBV (Crawford *et al.*, 2002).

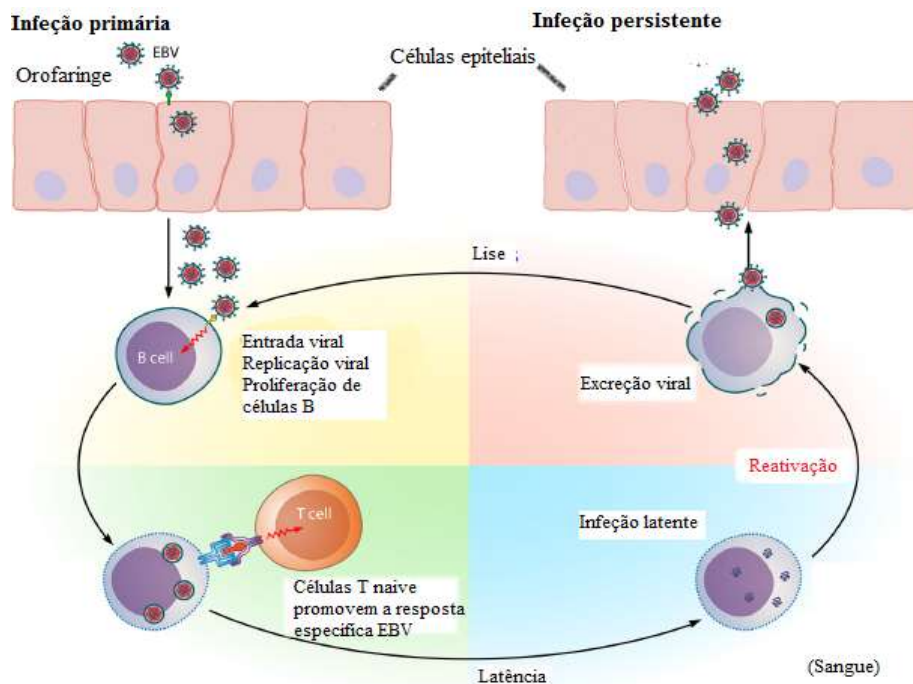


Figura 18: Ciclo lítico e de latência do vírus Epstein Barr. Adaptado de (Odumade *et al.*, 2011).

A entrada do vírus EBV é iniciada pela interação da glicoproteína gp350 com recetores da membrana celular, permitindo a ligação da proteína viral gp42 ao MHC II dos linfócitos B. Neste processo é necessária a participação das glicoproteínas gB, gH e gL. Depois da fusão viral, o genoma do vírus EBV é transportado para o núcleo onde a replicação viral e celular se inicia, resultando na proliferação explosiva de linfócitos B. Uma vez em circulação, os linfócitos B de memória previamente ativados podem sofrer replicação lítica ou podem entrar em estado de latência. Mais tarde os linfócitos B latentes podem ser ativados, resultando numa reativação e excreção do vírus (Odumade *et al.*, 2011) (Kirschner *et al.*, 2007).

A chave da transmissão deste vírus é a reativação do estado de latência ou a ativação da replicação lítica (Odumade *et al.*, 2011).

3.4.1 Terapêuticas

Nucleosídeos como o Aciclovir e o Valaciclovir são a única classe de antivirais avaliados para o tratamento da infecção por EBV, embora estes só atuem a nível da inibição da polimerase viral, que no caso do Aciclovir está associada à timidina cinase (Odumade *et al.*, 2011).

Relativamente à inibição da fusão viral, esta pode ser inibida por uma solução exógena da proteína gp42, inibindo a fusão viral por impedimento estérico da ligação ao recetor gB, embora esta terapêutica continue em estudos (Kirschner *et al.*, 2007). Vacinas para uso profilático, contendo antígenos de proteínas gp350 também tem sido avaliadas em estudos clínicos (Odumade *et al.*, 2011).

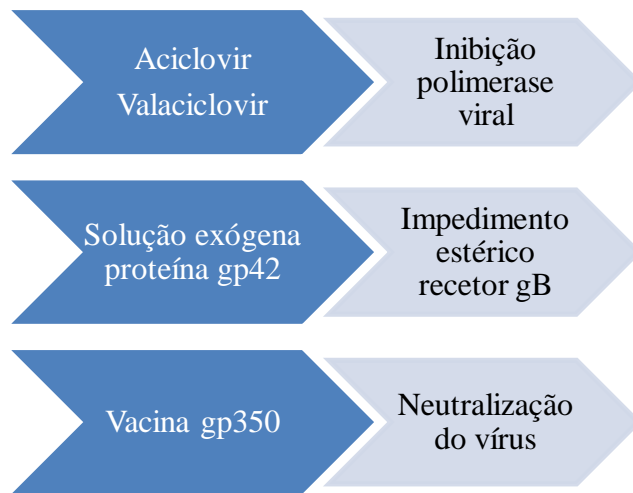


Figura 19: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores da fusão do vírus EBV. Adaptado de (Kirschner *et al.*, 2007; Odumade *et al.*, 2011).

3.5 Vírus HPV

Os Papiloma Virus Humanos (HPV) são uma família de pequenos vírus sem envelope que induzem maioritariamente papilomas benignos (Schelhaas *et al.*, 2012). Foram identificados mais de 100 diferentes tipos de HPV e aproximadamente 30 destes infetam os tecidos genitais (Ratanasiripong, 2012).

Estes genótipos podem ser diferenciados em tipos que afetam a parte cutânea ou a mucosa. Os tipos cutâneos são aqueles que ocorrem na maior parte da população e que causam epidermodisplasias verruciformes. Os tipos que afetam as mucosas podem ser divididos em tipos de baixo risco, médio risco ou alto risco (Kash *et al.*, 2015) e são detetados em maior quantidade em adolescentes e em menor quantidade em mulheres de idade adulta (Doorbar *et al.*, 2015)

Os HPV de alto risco (16 e 18) são responsáveis por cerca de 99,7% de todos os cancros do cólo do útero (Ratanasiripong, 2012).

As proteínas envolvidas na replicação do vírus são a E1 e a E2 e as responsáveis pela propagação do vírus são a L1 e a L2 (Doorbar *et al.*, 2015). As proteínas virais E6 e E7 estão implicadas na oncogénese viral (Kash *et al.*, 2015).

Os HPV podem ser isolados em indivíduos saudáveis, podendo persistir na população como comensais em vez de se associar com a doença patológica em si. Os viriões lançados da superfície epitelial podem ser transmitidos indiretamente (por fómites) ou por contato direto (Doorbar *et al.*, 2015).

Os viriões iniciam a sua atividade ligando-se à membrana basal por interações entre a proteína L1 e os HSPGs, originando mudanças conformacionais nas proteínas da cápside L1 e L2 (Griffin *et al.*, 2013) e ativando recetores como fatores de crescimento, dando início ao processo de Macropinocitose (Mercer e Helenius, 2012) .

Tabela 2 Tipos de infecções por HPV. Adaptado de (Doorbar *et al.*, 2015).

Tipos de Infecções por HPV	
Mucosas	Cutâneas
<p>Condilomas</p> <ul style="list-style-type: none"> • São as manifestações de HPV mais comuns na área genital. São caracterizados por pápulas, nódulos, pedúnculos, de cor rósea, filiformes. • São sexualmente transmissíveis. • Causadas por HPV de baixo risco: 6 e 11. 	<p>Verrugas “comuns”</p> <ul style="list-style-type: none"> • Podem compreender vários tamanhos. • Encontram-se nas mãos e joelhos, sobretudo em crianças. • A sua incidência aumenta nos indivíduos imunocomprometidos. • HPV do tipo 1,2,4, 27 e 57 são os tipos mais prevalentes.
<p>Hiperplasia epitelial focal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doença rara na mucosa oral relacionada com mulheres e crianças. As lesões estão localizadas no lábio inferior e podem afetar a língua, orofaringe e palato. • Causada pelos HPV 13 e 32. 	<p>Verrugas na planta do pé</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ocorrem nas crianças • Tipos prevalentes de HPV: 1 e 4 • As lesões são do tipo queratósicas muito dolorosas.
<p>Cancro do cólo do útero</p> <ul style="list-style-type: none"> • As lesões pré-cancerígenas são classificadas de acordo com diferentes graus em CIN 1,2 e 3 (do inglês Cervical Intraepithelial Neoplasia). • A gravidade da neoplasia é refletida na extensão e no aspeto das células basais. 	<p>Verrugas planas</p> <ul style="list-style-type: none"> • São lesões do tipo pigmentadas e ásperas. • Tipos prevalentes de HPV: 3 e 10
<p>Outros tipos de cancro (vulva, vagina, pénis e ânus)</p> <ul style="list-style-type: none"> • HPV 16 é o tipo mais prevalente. • O cancro no ânus é mais comum em indivíduos homossexuais, indivíduos com um historial de verrugas anais e em indivíduos imunocomprometidos. 	<p>Verrugas filiformes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lesões pedunculadas que crescem perpendicularmente ou obliquamente à superfície da pele. Os sítios mais comuns para o aparecimento destas lesões são a face e o pescoço. • Tipo mais comum: HPV 2

Cancro da cabeça e do pescoço	Cancro da pele
<ul style="list-style-type: none">• HPV é conhecido como o maior fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de cancro.• O HPV 16 é o tipo mais prevalente.	A Doença de Bowen ou carcinoma espinocelular <i>in situ</i> . Os tipos de HPV mais comuns são o 2,6,11,54, 61, 62 e 73 podendo também ser encontrado o tipo 16.

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de infeções por HPV são o tabaco, o tipo de HPV, a idade, a idade com que se inicia a vida sexual, número de parceiros, o uso do preservativo (que demonstra alguma proteção contra a infeção por HPV e a sua progressão), a imunocompetência do indivíduo, outras DST e os métodos contraceptivos orais (Ratanasiripong, 2012).

Embora não haja nenhuma cura para a infeção causada pelo HPV, há estratégias terapêuticas que visam detetar lesões pré-cancerígenas, como acontece com o exame regular do Papanicolau, para que o risco de desenvolvimento de cancro do colo do útero seja diminuído (Ratanasiripong, 2012). Este teste reduziu cerca de 80% a incidência do cancro do colo do útero (Kash *et al.*, 2015).

Em Portugal, a incidência do cancro do colo do útero e a mortalidade associada a esta patologia tem uma das maiores taxas da União Europeia (Medeiros *et al.*, 2005).

A chave para a redução da mortalidade e da morbilidade associadas a esta doença assenta na prevenção inicial da infeção por HPV através do desenvolvimento de vacinas profiláticas (Kash *et al.*, 2015).

3.5.1 Terapêuticas

As três vacinas (bivalente, tetravalente e nonavalente) são vacinas compostas principalmente por partículas semelhantes aos vírus (VLP) a partir de cópias da proteína estrutural L1, que depois dão origem a uma estrutura capaz de produzir anticorpos contra o vírus (Bruni *et al.*, 2015).

As três vacinas diferem em alguns aspectos, como a valência, a dose, os excipientes e o sistema de produção (Bruni *et al.*, 2015).

Todas as vacinas usam sais de alumínio como excipientes. A vacina tetravalente e a nonavalente utilizam um adjuvante do alumínio enquanto que a tetravalente contém na sua composição uma forma detoxificada de um lipopolissacárido e hidróxido de alumínio. As vacinas que na sua composição contenham estes últimos compostos têm a capacidade de produzir uma resposta duas vezes superior, comparativamente às que são constituídas com hidróxido de alumínio (Bruni *et al.*, 2015).

As vacinas têm uma maior eficácia quando são administradas a jovens antes do início da sua atividade sexual, sendo que não tem atividade terapêutica com infeções e lesões presentes no momento da vacinação. Estas vacinas demonstraram uma eficácia de 100% face a lesões graves de HPV (tipos 6,11, 16 e 18) e de 95% face a verrugas genitais. Relativamente aos homens sem infeção prévia, a eficácia na prevenção de lesões genitais externas (como os condilomas, neoplasia peniana, cancro perianal) ronda os 90%. A eficácia é menor naqueles que são vacinados e estão infetados (Bruni *et al.*, 2015).

A vacina nonavalente induz efeitos adversos mais frequentes do que as outras. Nestes incluem-se dor, eritema, prurido que estão relacionados com a maior quantidade de excipiente usado na vacina. Em relação à segurança, estas vacinas são geralmente bem toleradas e têm um adequado perfil de segurança (Bruni *et al.*, 2015).

Ainda não foram descritos inibidores do vírus HPV associados ao processo de Macropinocitose, contudo há várias moléculas que têm a capacidade de inibir o mecanismo de Macropinocitose e que por isso, podem vir a ser usadas em terapias futuras. De entre as quais destacam-se a Amilorida e os seus análogos que inibem a troca de protões na membrana plasmática, a Nistatina que atua ao nível do sequestro de moléculas de colesterol e as Citocalasina que inibe a Macropinocitose pela despolimerização dos filamentos de Actina (Khalil *et al.*, 2006).

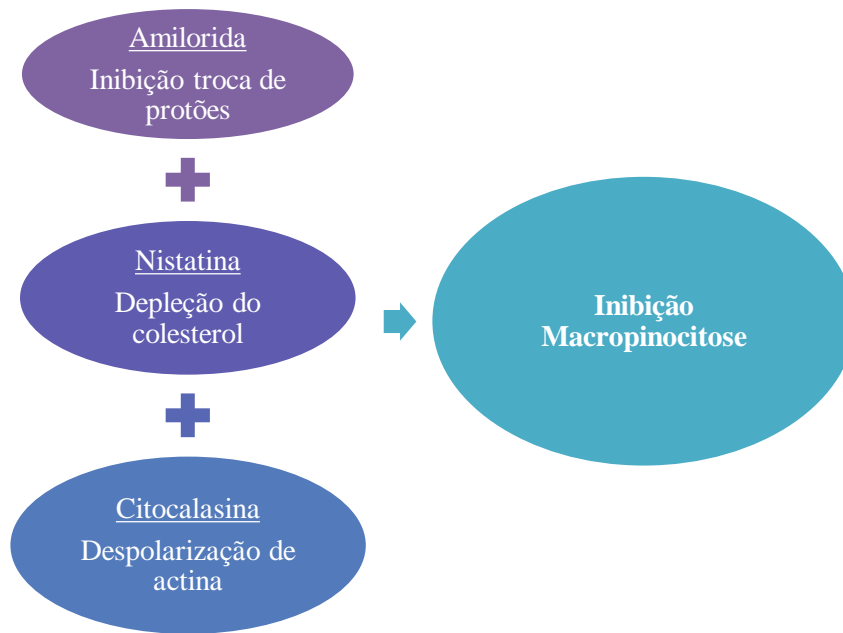


Figura 20: Possíveis terapêuticas para o EBV ao inibir o processo de entrada viral. Adaptado de (Khalil *et al.*, 2006).

3.6 Vírus Símio 40

O vírus símio 40 (SV40) é um vírus DNA sem envelope da família *Poliomaviridae* que induz oncogénese e que à medida que é sujeito a novas investigações, é considerado um dos vírus patogénicos mais emergentes nos dias de hoje (Vilchez e Butel, 2004).

A descoberta do SV40 está ligada ao desenvolvimento e distribuição por todo o mundo das vacinas contra a poliomielite. As formas inativas e posteriormente atenuadas das vacinas contra a poliomielite foram contaminadas com SV40. Isto aconteceu devido ao facto das vacinas serem preparadas com culturas de células de rins derivadas de macacos que estariam contaminados com SV40. Este vírus sobreviveu aos tratamentos de inativação das vacinas e infetou mais de 30 milhões de pessoas entre 1957 e 1963 (Butel, 2000; Garcea e Imperiale, 2003; Vilchez e Butel, 2004).

Após a sua descoberta, o SV40 demonstrou ser um potente agente oncogénico, induzindo em modelos animais cancro cerebral, tumores ósseos e linfomas. Após infetar a célula, o vírus símio 40 produz antigénios no ciclo celular que se ligam e bloqueiam importantes supressores tumorais como o p53, pRb, p107 e p130/Rb2 (Butel, 2000; Garcea e Imperiale, 2003; Vilchez e Butel, 2004).

As moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe I são os recetores para o vírus SV40. Este passo inicial no ciclo celular ajuda a explicar o amplo tropismo deste vírus e a sua capacidade para infetar e induzir transformações em muitas células e tecidos (Vilchez e Butel, 2004). Alguns animais desenvolvem meningoencefalites e outros tipos de doenças neurológicas, indicando que o SV40 é também considerado neurotrópico e tem a capacidade de induzir infeções que envolvem o sistema nervoso central (Butel, 2000).

O vírus SV40 tem a capacidade de se replicar produtivamente em células humanas, como tecidos fetais, células dos rins e linhagens celulares tumorais (Vilchez e Butel, 2004) e por isso deve ser considerado um agente infeccioso não só em animais como também em humanos (Butel, 2000). O DNA do vírus símio já foi detetado tumores cerebrais pediátricos e adultos, mesoteliomas, osteossarcomas (Butel, 2000) e em Linfomas não-Hodgkin (Garcea e Imperiale, 2003; Shah, 2004).

Os hospedeiros naturais do vírus são as espécies *Macacca mulatta*, provenientes da Ásia. O vírus estabelece infecções permanentes nos rins, sendo o meio de transmissão mais plausível a urina. A infecção em macacos saudáveis é assintomática contudo em animais com o sistema imune debilitado a infecção é bastante difundida (Vilchez e Butel, 2004).

A transmissão vertical é também uma das vias possíveis de propagação deste vírus (Vilchez e Butel, 2004)

Apesar das evidências de que o SV40 é patogénico tanto em animais como em humanos e que está envolvido numa série de doenças, são necessários mais estudos em diversas áreas, como avaliar a prevalência da infecção viral em diferentes populações mundiais, a sua transmissão de pessoa para pessoa, o desenvolvimento de ensaios e estudos com maior sensibilidade e especificidade (Vilchez e Butel, 2003).

3.6.1 Terapêuticas

Como já foi referido, as Caveolas são estruturas constituídas por Clatrina e Colesterol. Fármacos que se liguem especificamente ao colesterol inibem a internalização dos vírus mediada por Caveolina (Khalil *et al.*, 2006). Exemplos deste tipo de mecanismo de ação são a Nistatina, um fármaco que bloqueia seletivamente o mecanismo de Endocitose mediada por Caveolina pelo mecanismo de depleção que exerce no colesterol existente na membrana. O composto metil- β -ciclodextrina tem um mecanismo de ação semelhante ao da Nistatina (Anderson *et al.*, 1996).

A actina também tem um papel fundamental no mecanismo de ação da Caveolina. Fármacos que causem a despolimerização do citoesqueleto dos filamentos de actina, inibem o mecanismo de ação da Caveolina, como acontece com a Citocalasina (Khalil *et al.*, 2006).

O bloqueio das tirosinas cinases necessárias para a internalização do vírus SV40 (Marsh e Helenius, 2006) ou o uso de anticorpos anti-MHC I para que haja bloqueio do recetor (embora não seja a terapia mais aconselhada), são possíveis estratégias terapêuticas para a inibição da infecção do vírus SV40 (Stang *et al.*, 1997). Os fármacos responsáveis pelo bloqueio das cinases envolvidas no processo de Endocitose mediada por Caveolina são a Filipina e Genesteína (Pelkmans, 2005; Meertens *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2011).

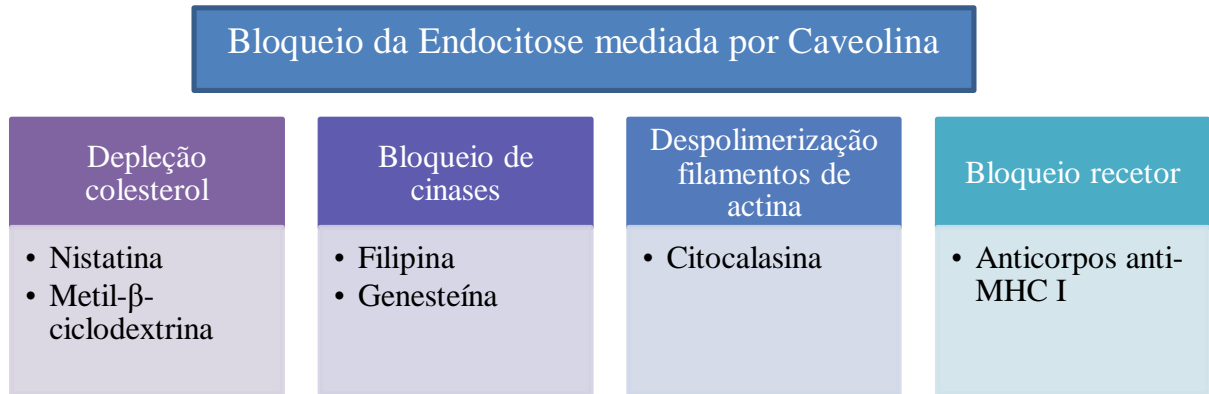


Figura 21: Estratégias para a inibição da infecção por SV40. Adaptado de (Anderson *et al.*, 1996; Stang *et al.*, 1997; Pelkmans, 2005; Khalil *et al.*, 2006; Marsh e Helenius, 2006; Meertens *et al.*, 2006).

3.7 Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C é um vírus RNA pertencente à família *Flaviviridae* (Major e Feinstone, 1997) com tropismo para as células do fígado, os hepatócitos (Heintges e Wands, 1997) infectando mais de 5 milhões de pessoas só na Europa (Abonyi e Lakatos, 2005).

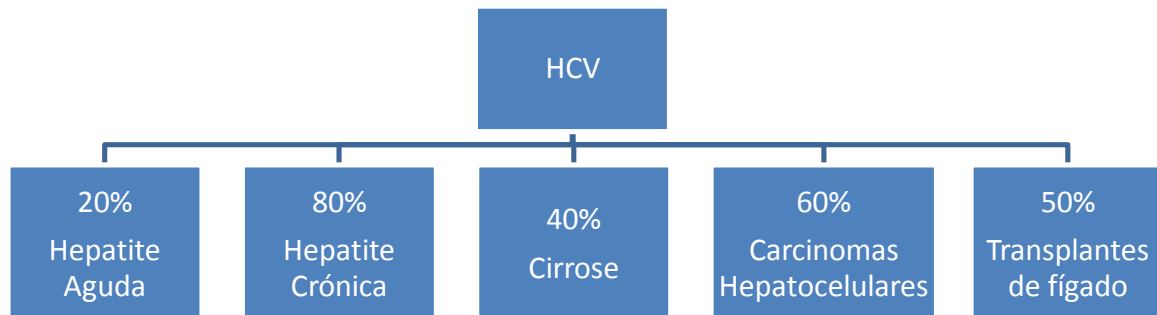


Figura 22: Patologias causadas pelo HCV. Adaptado de (Abonyi e Lakatos, 2005).

O HCV é transmitido pela via parenteral (a via mais eficaz de transmissão), por contato sanguíneo, vertical mãe-filho e por contato sexual (Heintges e Wands, 1997; Flint *et al.*, 2008).

De notar que o nível de transmissão aumenta caso hajam outros fatores e grupos de risco envolvidos tais como: toxicodependentes (devido à partilha de seringas e agulhas com sangue contaminado), hemofílicos, indivíduos infectados com HIV (as vias de transmissão são similares), hemodialisados e transplantados renais, abuso de álcool (Heintges e Wands, 1997) múltiplos parceiros sexuais, uso de acupuntura, piercings e tatuagens (Strader *et al.*, 2004) e acidentes de trabalho na área da saúde (Abonyi e Lakatos, 2005).

As manifestações clínicas desta infecção não são muito evidentes, sendo que os doentes são maioritariamente assintomáticos e a sua principal queixa é a fadiga, perda de peso e mais raramente icterícia e hepatomegalia. Em análises de rotina, esta infecção é identificada pelos níveis elevados de aminotransferases de aspartato ou de alanina. O HCV pode progredir para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepático (Flint *et al.*, 2008; Dienstag, 2012; Abonyi e Lakatos, 2005). De notar que nos doentes crónicos há uma elevada incidência de linfomas não Hodgkin (Abonyi e Lakatos, 2005).

3.7.1 Terapêuticas

O mecanismo de ação dos fármacos que atuam ao nível da inibição da Endocitose mediada por Clatrina passa por inibir a bomba de protões (Bafilomicina) e dissociar a rede de Clatrina (depleção de potássio, hipertonicidade e Clorpromazina) (Rejman *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2011).

Contudo, o tratamento *standard* para o tratamento da infeção por HCV é com o Interferão Peguilado e com a Ribavarina em que os seus principais mecanismos de ação são inibir a polimerase viral, diminuir os níveis de ALT e o aumento da expressão das proteínas do MHC para o reconhecimento de antigénios virais pelo sistema imune (Taylor *et al.*, 2000; Abonyi e Lakatos, 2005; Kieffer *et al.*, 2007).

Novos tratamentos antivirais direcionados para o tratamento de HCV incluem os inibidores da protease do HCV, o Telaprevir, a Valopicitabina (Kieffer *et al.*, 2007) e os oligonucleotídeos “*anti-sense*” (tratamento que utiliza os oligonucleotídeos, que agem no citoplasma ou núcleo da célula, para impedir a reprodução de agentes causadores de doenças) (Abonyi e Lakatos, 2005).

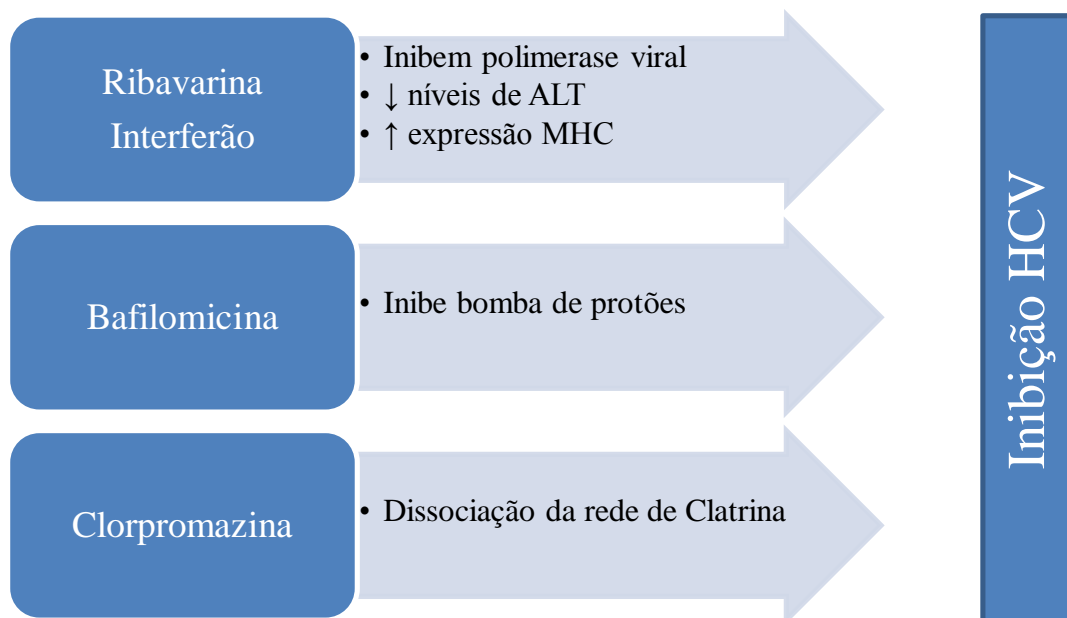


Figura 23: Resumo dos mecanismos de ação dos inibidores do vírus HCV. Adaptado de (Taylor *et al.*, 2000; Abonyi e Lakatos, 2005; Rejman *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Kieffer *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2011).

4. Conclusão

Foi objetivo deste trabalho efetuar uma revisão bibliográfica acerca dos mecanismos de entrada viral, exemplificando com vírus que utilizam diferentes meios de infectar as células, abordar as terapias atuais e possíveis estratégias de terapia futuras.

Para isso foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre os diferentes mecanismos de entrada viral e terapias associadas a cada vírus exemplificado, utilizando-se a base de dados *Pubmed* e livros como o *Principles of Virology* ou *Virology: Principles and Applications*.

Como conclusão final e porque o principal foco desta monografia é a entrada do vírus nas células, observou-se que a entrada dos vírus faz-se de modo aleatório pois é possível um único vírus usar vários mecanismos de entrada viral, como acontece por exemplo no HCV em que usa a Endocitose mediada por Clatrina para entrar na célula hospedeira, como também pode usar os Exossomas para esse fim.

Conclui-se também que o mecanismo de entrada viral mais utilizado pelos vírus é a Endocitose mediada por Clatrina e que o valor de pH torna-se determinante para que a fusão viral ocorra.

Relativamente às terapêuticas antivirais, as melhores caracterizadas e as que efetivamente se relacionam com a entrada viral são as direcionadas para o vírus Influenza e para o HIV, em que as estratégias de inibição da entrada viral passam pelo bloqueio da ligação do vírus aos principais recetores. Em contrapartida, nos outros vírus exemplificados, as terapêuticas usadas são direcionadas para a inibição da polimerase viral ou para a indução da resposta imunitária com o uso de vacinas.

Contudo, novas estratégias terapêuticas têm sido estudadas e desenvolvidas para inibir os vários mecanismos de entrada viral descritos nesta monografia, tais como o uso de anticorpos monoclonais para o bloqueio da ligação ao recetor, o uso de metais como o zinco ou o de fármacos como a Clorpromazina, Amilorida, Nistatina, Citocalasina ou Bafilomicina.

Assim, o progresso científico para a descoberta de novos alvos para a terapia antiviral deve ser cada vez mais focado em aspectos essenciais do hospedeiro, que proteínas estão associadas à entrada dos vírus nas células ou como é que a replicação viral ocorre.

Dependente da investigação científica está a emergência de novos alvos terapêuticos, de terapias alternativas e conseqüentemente de novos fármacos para que as terapias antivirais futuras sejam bem-sucedidas e eficazes no combate à imensidão de mutações que tanto vírus como hospedeiros vão sofrendo ao longo dos tempos.

5. Referências bibliográficas

Abonyi, M. E. e Lakatos, P. L. (2005). Ribavirin in the treatment of hepatitis C. *Anticancer Res*, 25, pp. 1315-20.

Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., *et al.* (1995). Oligomeric rearrangement of tickborne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol*, 69, pp. 695-700.

Anderson, H. A., Chen, Y. e Norkin, L. C. (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell*, 7, pp. 1825-34.

Arts, E. J. e Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, pp. a007161.

Backovic, M. e Jardetzky, T. S. (2009). Class III viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 19, pp. 189-96.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., *et al.* (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 80, pp. 6964-72.

Boere, W. A., Benaissa-Trouw, B. J., Harmsen, T., *et al.* (1985). Mechanisms of monoclonal antibody-mediated protection against virulent Semliki Forest virus. *J Virol*, 54, pp. 546-51.

Briz, V., Poveda, E. e Soriano, V. (2006). HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother*, 57, pp. 619-27.

Bruni, L., Serrano, B., Bosch, X., *et al.* (2015). [Human papillomavirus vaccine. Efficacy and safety]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33, pp. 342-54.

Butel, J. S. (2000). Simian virus 40, poliovirus vaccines, and human cancer: research progress versus media and public interests. *Bull World Health Organ*, 78, pp. 195-8.

Carter, J. e Saunders, V. (2007). *Virology: Principles and Applications*. Chichester, Wiley.

Chazal, N. e Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, pp. 226-37, table of contents.

Chen, H. W., Cheng, J. X., Liu, M. T., *et al.* (2013). Inhibitory and combinatorial effect of diphyllin, a v-ATPase blocker, on influenza viruses. *Antiviral Res*, 99, pp. 371-82.

Christianson, H. C., Svensson, K. J. e Belting, M. (2014). Exosome and microvesicle mediated phenone transfer in mammalian cells. *Semin Cancer Biol*, 28, pp. 31-8.

Cohen, J. I. (2009). Optimal treatment for chronic active Epstein-Barr virus disease. *Pediatr Transplant*, 13, pp. 393-6.

Crawford, D. H., Swerdlow, A. J., Higgins, C., *et al.* (2002). Sexual history and Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis*, 186, pp. 731-6.

Damm, E. M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., *et al.* (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol*, 168, pp. 477-88.

Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., *et al.* (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, 25 Suppl 1, pp. 2-23.

Eckert, D. M. e Kim, P. S. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 70, pp. 777-810.

Edinger, T. O., Pohl, M. O., Yanguéz, E., *et al.* (2015). Cathepsin W Is Required for Escape of Influenza A Virus from Late Endosomes. *MBio*, 6.

Engel, S., Heger, T., Mancini, R., *et al.* (2011). Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J Virol*, 85, pp. 4198-211.

Fazakerley, J. K. (2002). Pathogenesis of Semliki Forest virus encephalitis. *J Neurovirol*, 8 Suppl 2, pp. 66-74.

Flint, S. J., Enquist, L. W. e Racaniello, V. R. (2008). *Principles of Virology, Vol. 1: Molecular Biology*. Washington, ASM Press.

Gobeil, L. A., Lodge, R. e Tremblay, M. J. (2012). Macropinocytosis-like HIV-1 internalization in macrophages is CCR5 dependent and leads to efficient but delayed degradation in endosomal compartments. *J Virol*, 87, pp. 735-45.

Griffin, L. M., Cicchini, L. e Pyeon, D. (2013). Human papillomavirus infection is inhibited by host autophagy in primary human keratinocytes. *Virology*, 437, pp. 12-9.

Grywalska, E., Markowicz, J., Grabarczyk, P., *et al.* (2013). Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 67, pp. 481-90.

Heintges, T. e Wands, J. R. (1997). Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology*, 26, pp. 521-6.

Kash, N., Lee, M. A., Kollipara, R., *et al.* (2015). Safety and Efficacy Data on Vaccines and Immunization to Human Papillomavirus. *J Clin Med*, 4, pp. 614-33.

Keogh, B., Atkins, G. J., Mills, K. H., *et al.* (2002). Avirulent Semliki Forest virus replication and pathology in the central nervous system is enhanced in IL-12-defective and reduced in IL-4-defective mice: a role for Th1 cells in the protective immunity. *J Neuroimmunol*, 125, pp. 15-22.

Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., *et al.* (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev*, 58, pp. 32-45.

Kieffer, T. L., Sarrazin, C., Miller, J. S., *et al.* (2007). Telaprevir and pegylated interferonalpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology*, 46, pp. 631-9.

Kielian, M. (2006). Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, 344, pp. 38-47.

Kirschner, A. N., Lowrey, A. S., Longnecker, R., *et al.* (2007). Binding-site interactions between Epstein-Barr virus fusion proteins gp42 and gH/gL reveal a peptide that inhibits both epithelial and B-cell membrane fusion. *J Virol*, 81, pp. 9216-29.

Lee, S. M. e Yen, H. L. (2012). Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res*, 96, pp. 391-404.

Li, F., Berardi, M., Li, W., *et al.* (2006). Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain. *J Virol*, 80, pp. 6794-800.

Lin, P. F., Blair, W., Wang, T., *et al.* (2003). A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, pp. 11013-8.

Liu, C. Y. e Kielian, M. (2012). Identification of a specific region in the e1 fusion protein involved in zinc inhibition of semliki forest virus fusion. *J Virol*, 86, pp. 3588-94.

Liu, Z., Zhang, X., Yu, Q., *et al.* (2014). Exosome-associated hepatitis C virus in cell cultures and patient plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 455, pp. 218-22.

Lundstrom, K. (2003). Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1610, pp. 90-6.

Lundstrom, K. (2005). Biology and application of alphaviruses in gene therapy. *Gene Ther*, 12 Suppl 1, pp. S92-7.

Lundstrom, K., Schweitzer, C., Rotmann, D., *et al.* (2001). Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett*, 504, pp. 99-103.

Luria, S. E., Darnell, J. J. E., Baltimore, D., *et al.* (1978). *General Virology*. London John Wiley And Sons Inc.

Major, M. E. e Feinstone, S. M. (1997). The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology*, 25, pp. 1527-38.

Marechal, V., Prevost, M. C., Petit, C., *et al.* (2001). Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*, 75, pp. 11166-77.

Markosyan, R. M. e Cohen, F. S. (2013). The transmembrane domain and acidic lipid flip-flop regulates voltage-dependent fusion mediated by class II and III viral proteins. *PLoS One*, 8, pp. e76174.

Marsh, M. e Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell*, 124, pp. 729-40.

Mathiot, C. C., Grimaud, G., Garry, P., *et al.* (1990). An outbreak of human Semliki Forest virus infections in Central African Republic. *Am J Trop Med Hyg*, 42, pp. 386-93.

Medeiros, R., Prazeres, H., Pinto, D., *et al.* (2005). Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a southern European population at high risk of cervical cancer. *Eur J Cancer Prev*, 14, pp. 467-71.

Meertens, L., Bertaux, C. e Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol*, 80, pp. 11571-8.

Melikyan, G. B. (2014). HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Curr Opin Virol*, 4, pp. 1-7.

Mercer, J. e Helenius, A. (2012). Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Curr Opin Microbiol*, 15, pp. 490-9.

Modis, Y. (2013). Class II fusion proteins. *Adv Exp Med Biol*, 790, pp. 150-66.

Nguyen, J. T., Smee, D. F., Barnard, D. L., *et al.* (2012). Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine resistant influenza A viruses. *PLoS One*, 7, pp. e31006.

Nour, A. M. e Modis, Y. (2014). Endosomal vesicles as vehicles for viral genomes. *Trends Cell Biol*, 24, pp. 449-54.

Odumade, O. A., Hogquist, K. A. e Balfour, H. H., Jr. (2011). Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev*, 24, pp. 193-209.

Parton, R. G. e Richards, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, 4, pp. 724-38.

Pelkmans, L. e Helenius, A. (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 15, pp. 414-22.

Pernet, O., Pohl, C., Ainouze, M., *et al.* (2009). Nipah virus entry can occur by macropinocytosis. *Virology*, 395, pp. 298-311.

Ratanasiripong, N. T. (2012). A review of human papillomavirus (HPV) infection and HPV vaccine-related attitudes and sexual behaviors among college-aged women in the United States. *J Am Coll Health*, 60, pp. 461-70.

Salomon, R. e Webster, R. G. (2009). The influenza virus enigma. *Cell*, 136, pp. 402-10.

Schelhaas, M., Shah, B., Holzer, M., *et al.* (2012). Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog*, 8, pp. e1002657.

Shah, K. V. (2004). Simian virus 40 and human disease. *J Infect Dis*, 190, pp. 2061-4.

Sims, B., Gu, L., Krendelchtchikov, A., *et al.* (2014). Neural stem cell-derived exosomes mediate viral entry. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 4893-7.

Singh, B., Huang, H. C., Morton, D. P., *et al.* (2015). Optimizing distribution of pandemic influenza antiviral drugs. *Emerg Infect Dis*, 21, pp. 251-8.

Stang, E., Kartenbeck, J. e Parton, R. G. (1997). Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol Biol Cell*, 8, pp. 47-57.

Stiasny, K., Allison, S. L., Schalich, J., *et al.* (2002). Membrane interactions of the tickborne encephalitis virus fusion protein E at low pH. *J Virol*, 76, pp. 3784-90.

Strader, D. B., Wright, T., Thomas, D. L., *et al.* (2004). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, 39, pp. 1147-71.

Sun, D., Zhuang, X., Zhang, S., *et al.* (2012). Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, pp. 342-7.

Sun, X., Yau, V. K., Briggs, B. J., *et al.* (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology*, 338, pp. 53-60.

Suzuki, T. e Suzuki, Y. (2006). Virus infection and lipid rafts. *Biol Pharm Bull*, 29, pp.1538-41.

Tan, A., Rajadas, J. e Seifalian, A. M. (2013). Exosomes as nano-theranostic delivery platforms for gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, pp. 357-67.

Thorley, J. A., Mckeating, J. A. e Rappoport, J. Z. (2010). Mechanisms of viral entry: sneaking in the front door. *Protoplasma*, 244, pp. 15-24.

Ungewickell, E. J. e Hinrichsen, L. (2007). Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*, 19, pp. 417-25.

Vanderlinden, E. e Naesens, L. (2013). Emerging antiviral strategies to interfere with influenza virus entry. *Med Res Rev*, 34, pp. 301-39.

Vilchez, R. A. e Butel, J. S. (2003). SV40 in human brain cancers and non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 22, pp. 5164-72.

Vilchez, R. A. e Butel, J. S. (2004). Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. *Clin Microbiol Rev*, 17, pp. 495-508, table of contents.

Weissenhorn, W., Hinz, A. e Gaudin, Y. (2007). Virus membrane fusion. *FEBS Lett*, 581, pp. 2150-5.

White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., *et al.* (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43, pp. 189-219.

Wilén, C. B., Tilton, J. C. e Doms, R. W. (2012a). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.

Wilén, C. B., Tilton, J. C. e Doms, R. W. (2012b). Molecular mechanisms of HIV entry. *Adv Exp Med Biol*, 726, pp. 223-42.

Zaraket, H., Bridges, O. A., Duan, S., *et al.* (2013). Increased acid stability of the hemagglutinin protein enhances H5N1 influenza virus growth in the upper respiratory tract but is insufficient for transmission in ferrets. *J Virol*, 87, pp. 9911-22.