

BÁRBARA DE MAGALHÃES SILVEIRA

“VÍRUS AO SERVIÇO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA”



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

PORTO, SETEMBRO DE 2013

BÁRBARA DE MAGALHÃES SILVEIRA

“VÍRUS AO SERVIÇO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA”

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

PORTO, SETEMBRO DE 2013

BÁRBARA DE MAGALHÃES SILVEIRA

“VÍRUS AO SERVIÇO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA”

Trabalho Apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

SUMÁRIO

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, conhecidos por infectarem e causarem doença em humanos. Com base na sua capacidade de se replicarem dentro de um organismo, os vírus têm vindo a ser estudados, com o intuito de causarem efeitos benéficos no tratamento de determinadas patologias, ou seja, como verdadeiras máquinas que se encontram ao dispor da indústria farmacêutica. Assim, ao longo deste texto, foi realizado um primeiro enquadramento teórico em que se pretendeu definir vírus, classificá-los segundo as estratégias que utilizam para produzir o mRNA (Classificação de Baltimore), caracterizá-los quanto à sua composição e morfologia, assim como, abordar as principais etapas do seu ciclo de replicação viral e definir as principais formas de transmissão e os principais tipos de infecção viral. Seguidamente, revelou-se de interesse, realizar uma breve revisão teórica do que têm vindo a ser estudado com maior ênfase nesta temática. Aqui, incluem-se por exemplo, a possibilidade da sequenciação de vírus por parte da indústria, bem como de que formas estes têm vindo a ser utilizados pela mesma: tipos de vectores virais mais utilizados, avanços potenciados no desenvolvimento de novas vacinas e o crescente interesse da utilização de bacteriófagos no combate a determinadas patologias. Para terminar, abordou-se um pouco do que têm a vindo a ser realizado por parte da disciplina da biotecnologia paralelamente à indústria farmacêutica no que respeita à disponibilização crescente de novas abordagens terapêuticas, com especial destaque para os *aptamers*, *tecnologia antisense* e *tecnologia DRACO*.

ABSTRACT

Viruses are obligate intracellular parasites, commonly known by their capacity to infect and cause disease in humans. Based on this ability, viruses have been studied with the aim of causing beneficial effects in the treatment of certain diseases, in other words they have been studied as real machines that are available for pharmaceutical industry. Thus, throughout this paper, we've started by a clear definition of viruses, classified them according to certain characteristics and by *Baltimore*, have characterized them according to their composition and morphology. Furthermore, we've analyzed the key

steps of its viral cycle of replication and had defined the kinds of transmission as well as the main types of viral infection. Subsequently, it was made a research about what has been studied with more emphasis to date about this theme. Here we've included the possibility of sequencing virus by the industry as well as the most common viral vectors used, the new developments in vaccines and the increasing interest of using bacteriophages in order to combat some diseases. Finally, we've tried to make a parallelism between biotechnology developments and the new archives made by industry with focus on the new therapeutic approaches, with particular emphasis on *aptamers, oligonucleotides antisense and DRACO technology*.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir uma das principais etapas da minha vida, não posso deixar de manifestar o meu público testemunho de agradecimento a todos quanto, de uma forma ou de outra, tornaram possível chegar até aqui.

À minha família, em particular, aos meus pais, irmãs e ao meu marido, pelo incentivo, compreensão e encorajamento, durante todo este período.

Com especial destaque, desejo agradecer ao meu orientador Professor Doutor Ricardo Magalhães, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência e dedicação.

Aos meus amigos, e aos meus colegas de curso e de trabalho, pelos momentos de entusiasmo partilhados em conjunto.

A todos o meu sincero obrigado, porque sem vocês nada disto teria sido possível.

Bárbara Silveira.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
I – VÍRUS.....	1
1.1. Classificação	2
1.1.1. Classificação de Baltimore	3
1.2. Composição	4
1.3. Morfologia	4
1.4. Ciclo de replicação viral: etapas gerais	5
1.5. Formas de transmissão e tipos de infecção viral	7
II – REVISÃO TEÓRICA	8
1.1. Novas Possibilidades na Indústria farmacêutica	8
1.2. Vírus e Terapia	8
1.2.1. Vectores Virais	8
i. Vírus como agentes terapêuticos	11
1.2.2. Bacteriófagos	13
1.2.3. Vacinas	16
i. Novos Avanços Científicos na Era das Vacinas	17
III – NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	20
1.1. Biotecnologia.....	20
1.2. <i>Aptamers</i> e a Descoberta de Novos Fármacos Anti-Virais	21
1.3. Tecnologia Antisense	24
1.4. DRACO: <i>Double-stranded RNA Activated Caspase Oligomerizer</i>	27
1.5. Um caso de estudo: DPOC	29
IV – CONCLUSÕES.....	32
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Sistema de classificação de Baltimore. Fonte: (W. F. C. Ferreira et al. 2010)</i>	3
<i>Figura 2 – Imagem representativa das diferentes morfologias virais.</i>	5
<i>Figura 3 – Distintos tipos de vírus. Fonte: Google images.</i>	5
<i>Figura 4 – Algumas opções de direccionamento dos vectores às células-alvo. Fonte: (Bouard et al. 2009)</i>	10
<i>Figura 5 – Ciclos replicativos de fagos líticos (A) e lisogénicos (B) Fonte:(Sulakvelidze et al. 2001)</i>	15
<i>Figura 6 – Linha temporal representativo das vacinas em uso comercial. Fonte: (Nabel 2013).....</i>	17
<i>Figura 7 – Mecanismos pelos quais as glicoproteínas virais medeiam a sua entrada na célula hospedeira. (A) HIV; (B) Influenza; (C) Meningococcus. Fonte: (Nabel 2013).....</i>	18
<i>Figura 8 – Processo SELEX. Fonte: (Binning et al. 2012)</i>	21
<i>Figura 9 – Passos fundamentais do ciclo viral como alvos para o desenvolvimento de aptameros. Fonte: (Binning et al. 2012).....</i>	23
<i>Figura 10 – Esquema representativo do funcionamento da tecnologia antisense.....</i>	25
<i>Figura 11 – (A) Mecanismo passivo.(B) Mecanismo activo.</i>	26

Figura 12 – Mecanismo de actuação do DRACO. Fonte:(www.theairspace.net.)..... 28

*Figura 13- Figura representativa da efectividade do DRACO contra dois tipos de vírus.
Fonte: (www.theairspace.net) 29*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades virais e respectivas consequências 1

Tabela 2 – Formas de classificação taxonómica dos virus 2

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ao longo deste trabalho irão surgir algumas abreviaturas, nomeadamente:

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

DPOC. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica.

DRACO. Double Stranded RNA Activated Caspase Oligomerizer.

ELISA. Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay.

HBV. Vírus da Hepatite b.

HCMV. Citomegalovirus Humano.

HCV. Vírus da Hepatite C.

HIV. Vírus da Imunodeficiência Humana.

HIV-RT. Transcriptase Reversa do HIV.

HRV. *Rinovirus* humano

mRNA. Ácido ribonucleico mensageiro.

ODN. Oligonucleotidos antisense

RNA. Ácido ribonucleico.

SELEX . Evolução Sistemática de Ligandos por Enriquecimento Exponencial

INTRODUÇÃO

I – VÍRUS

Ao contrário de outros microrganismos como fungos e parasitas, os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, são microrganismos que dependem do hospedeiro para replicarem, uma vez que não tem a capacidade de sintetizar proteínas, bem como não dependem da obtenção de energia para sobreviverem. Ao contrário dos vírus mais complexos como por exemplo os minivírus, os vírus mais simples, são compostos por genoma de DNA ou RNA, protegidos por uma estrutura proteica e por vezes também por uma membrana. Além disso, os vírus otimizarão-se por mutação e selecção, de forma a conseguirem sobreviver às condições fisiológicas e ultrapassarem as barreiras físicas, como por exemplo o epitélio intestinal, para conseguirem interagir com a célula hospedeira e escapar á eliminação por parte da resposta imunitária. As definições e propriedades dos vírus e respectivas consequências das propriedades virais encontram-se sumariadas na tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades virais e respectivas consequências

DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES DOS VÍRUS	CONSEQUÊNCIAS DAS PROPRIEDADES VIRAIS
Os vírus são agentes com capacidade infecciosa em vários domínios (Eukarya, Archaea e Bacteria).	Não sobrevivem independentemente.
São parasitas intracelulares obrigatórios.	Devem ser infecciosos para perdurarem na natureza.
Não conseguem produzir energia ou proteínas independentemente da célula hospedeira.	Necessitam da célula hospedeira para produzir os seus componentes (mRNA viral, proteínas e cópias idênticas do genoma).
Os componentes virais não se replicam por divisão.	Mas tem a capacidade de se auto-organizarem.
O genoma pode ser RNA ou DNA, nunca os dois ¹ .	Poderão ou não ter invólucro, mas todos têm cápside..

¹ Como excepção existem os vírus RNA-RT e DNA-RT, em que os primeiros são vírus que possuem genoma constituído por RNA de cadeia simples positiva que ao replicarem material genético, geram

1.1. Classificação

Existe uma enorme variedade de vírus, que variam desde os mais simples e pequenos, como os *parvovirus* e *picornavirus*, até aos mais complexos como os *poxxvirus* e os *herpesvirus*. A sua classificação taxonómica pode ser caracterizada segundo a sua estrutura, características bioquímicas, doença associada, modo de transmissão ou órgão/tecido para o qual tem afinidade. As formas de classificação encontram-se sumariadas na tabela 2.

Tabela 2 – Formas de classificação taxonómica dos vírus

MODOS DE CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DOS VÍRUS	
Estrutura	Tamanho, morfologia. ácido nucleico (Exp.: Picornavírus)
Características bioquímicas	Estrutura e modo de replicação.
Doença	Exp.: hepatite vírus; encefalopatia vírus.
Modo de transmissão	Exp.: arbovírus (por insectos)
Célula hospedeira	Animal (humana, rato, ave), plantas, fungos
Tecido ou órgão	Adenovírus (aparelho respiratório), enterovírus (aparelho gastro intestinal).

Porém, a classificação taxonómica dos vírus não tem sido consensual. Segundo as “orientações do ICTV, comité internacional responsável pela definição das regras universais para a classificação e nomenclatura dos vírus, os principais critérios a utilizar (...) na classificação de vírus”(W. F. C. Ferreira et al. 2010) são:

- i. tipo e estrutura do genoma: que poderá ser de DNA ou RNA, de cadeia dupla ou simples, infeccioso ou não. Além disso, o genoma pode também ser

moléculas de DNA de cadeia dupla intermediárias. Relativamente aos vírus DNA-RT, estes são compostos por DNA de cadeia dupla, mas que geram moléculas de RNA de cadeia simples positiva.

monomérico, dimérico ou polimérico; circular ou linear e ainda com polaridades variáveis.

- ii. estrutura do virião e sua composição bioquímica: podendo estes ser icosaédricos, helicoidais ou mistos, com ou sem invólucro lipídico.
- iii. tipo de hospedeiro: animais (vertebrados ou invertebrados), plantas, fungos, bactérias, etc.
- iv. estratégia replicativa: que se define pela estratégia de Baltimore, que se baseia na forma de síntese do mRNA viral ao longo do ciclo replicativo, e que será analisada em detalhe de seguida.

1.1.1. Classificação de Baltimore

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, que dependem da tradução celular para se replicarem. Considerando isto, David Baltimore propôs uma classificação das estruturas de transcrição dos genomas virais, em sete grupos, que se encontram sumariados na figura seguinte.

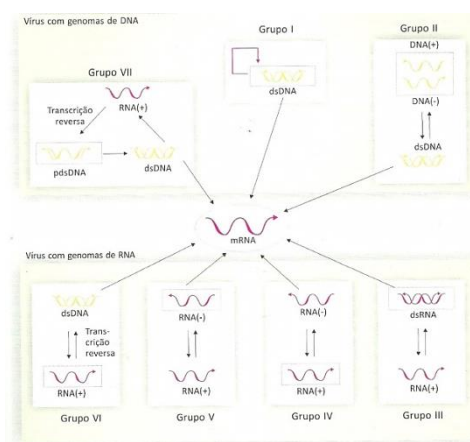


Figura 1 – Sistema de classificação de Baltimore. Fonte: (W. F. C. Ferreira et al. 2010)

O grupo I, é formado por vírus DNA de cadeia dupla, linear ou circular. Entre outros salientam-se, *herpesvirus*, *papilomavirus*, *adenovírus* ou *poxvirus*. O grupo II, compreende vírus DNA de cadeia simples, em que a formação do seu genoma depende da formação de intermediários replicativos de DNA de cadeia dupla. No grupo III, incluem-se vírus cujos genomas são moléculas RNA de cadeia dupla, como por exemplo *cistovírus* (que infectam bactérias) e os *reovírus*. Os grupos IV e V, são mutuamente opostos. O primeiro, é formado por vírus com genoma RNA de polaridade

positiva, enquanto que o último, compreende vírus que apresentem genoma RNA de polaridade negativa. Os *retrovírus*, que por sua vez, se incluem no grupo VI, são vírus RNA de polaridade positiva. Finalmente o grupo VII, é formado por vírus compostos por moléculas de DNA circulares, parcialmente em cadeia dupla, onde se incluem os *hepadnavírus* e os *caulimovírus*.

1.2. Composição

Quanto á sua composição bioquímica, os vírus, são essencialmente constituídos por ácido nucleico (RNA e DNA) e proteínas. Estas últimas, formam uma estrutura que protege o genoma viral e que se designa de cápside. Das principais funções da cápside viral, saliento a protecção contra diversos tipos de agentes, sejam eles, químicos, físicos ou enzimáticos, bem como a ligação a receptores celulares, que possibilita a entrada dos vírus na célula hospedeira. Ás subunidades proteicas que compõem a cápside dá-se o nome de protómeros, enquanto as unidades que se encontram á superfície designam-se de capsómeros. Todos estes constituintes, no seu conjunto são designados de virião.

Do virião, podem ainda fazer parte outras estruturas, nomeadamente: i) proteínas não estruturais; ii) invólucro - que consiste numa bicamada fosfolipídica.

1.3. Morfologia

Em termos morfológicos os vírus, são estruturas bastante diversificadas entre si. Relativamente ao seu tamanho, são na sua maioria estruturas microscópicas de dimensões entre os 20 e os 400nm. Existem no entanto algumas excepções, como por exemplo os *inovírus*, o vírus da ébola, os *megavírus* ou os *pandoravírus*², cujo tamanho no caso dos dois últimos se assemelha ao de algumas bactérias. Quanto á sua forma, e de um modo sucinto, podem ser, filiformes ou esféricos, longos ou curtos, flexíveis ou rígidos.

² Revista Science, Julho 2013.

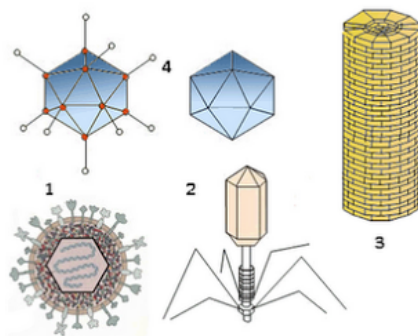


Figura 2 – Imagem representativa das diferentes morfologias virais.

(1) Com invólucro; (2) Complexos; (3) Helicoidais; (4) Poliédricos Fonte: Google images.

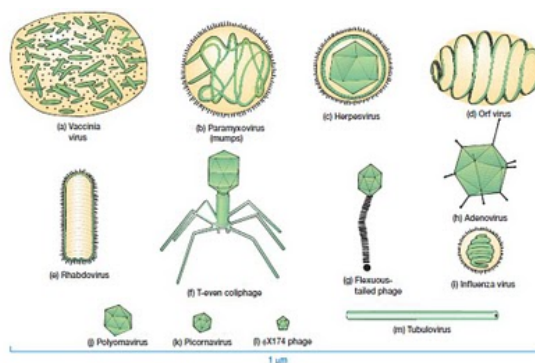


Figura 3 – Distintos tipos de vírus. Fonte: Google images.

1.4. Ciclo de replicação viral: etapas gerais

A replicação dos vírus é um processo bastante complexo, dependendo do tipo de ácido nucleico e da organização do genoma. O ciclo de replicação viral é contínuo, porém, numa tentativa de o estudar e compreender melhor, este é comumente dividido em várias etapas de replicação, encontrando-se estas sumariadas em seguida:

- i. Adsorção: consiste numa interação entre o virião e a célula-alvo. Trata-se de uma ligação indispensável para que o vírus introduza o seu genoma, mas que não é obrigatoriamente sinónimo de que ocorra replicação, pois depende da disponibilidade de receptores existentes á superfície da célula. Esta fase não

depende de factores como a temperatura, no entanto é mediada pela composição iónica do meio, que vai diminuir a repulsão electrostática entre componentes virais e celulares. Além disto, as proteínas virais (maioritariamente glicoproteínas, ou também moléculas de ácido siálico ou moléculas de sulfato de heparano), responsáveis pela adsorção dos vírus às células alvo, poderão reconhecer mais receptores celulares

- ii. Penetração: ocorre quase imediatamente após a adsorção e consiste na injeção do ácido nucleico viral na célula hospedeira. Este processo, é termo dependente e pressupõe o consumo de energia (resultante da hidrólise de ATP). Este processo, poderá ocorrer de diferentes formas:
 - a. Se os vírus não possuírem invólucro, poderão penetrar directamente as células-alvo através, ora da translocação da membrana celular, ora da sua inclusão em vesículas de endocitose.
 - b. No caso de vírus com invólucro, para além das possibilidades anteriores, existe ainda a possibilidade de penetrar as células hospedeiras através da fusão directa com a membrana citoplasmática.
- iii. Descapsidação: baseia-se na desintegração total ou parcial das partículas virais, permitindo-se a libertação do seu genoma. Esta fase ocorre no interior das células infectadas.
- iv. Fase de biossíntese: é a fase em que se produzem as proteínas virais e durante a qual se replicam os genomas. Tem de existir a capacidade de gerar mRNA's que sejam reconhecidos e traduzidos. Ou seja, é nesta fase que ocorre a replicação e transcrição do genoma viral. Estas etapas, são asseguradas ora por proteínas celulares assistidas por proteínas virais como *papilomavírus*, ou *parvovírus*, por exemplo, ora por proteínas codificadas pelo genoma viral, como por exemplo *poxvírus* e *mimivírus*. Independentemente dos casos, para além das proteínas directamente envolvidas na replicação e transcrição viral e dos componentes estruturais dos viriões, muitos genomas virais codificam ainda outras proteínas que se pensa estarem implicadas na optimização da replicação viral das células infectadas. Destacando-se por exemplo a capacidade de controlar o ciclo celular, da supressão da apoptose ou de escapar á resposta imune do hospedeiro (células NK). (W. F. C. Ferreira et al. 2010)

A fase de biossíntese, pode ser ainda dividida em duas: “A primeira, designada de fase precoce, inicia-se com a adsorção e entrada do vírus na célula, culmina

com o início da replicação do genoma viral e nela são produzidas proteínas de natureza reguladora e enzimas virais. Após a replicação do genoma viral se ter iniciado, a fase de biossíntese entra na sua fase tardia, durante a qual se acumulam as proteínas necessárias á formação das partículas virais. (...) Por fim, a replicação culmina “com a montagem dos componentes estruturais, a encapsidação dos genomas e com a saída das respectivas células infectadas”. Esta libertação dos vírus, poderá ocorrer, no caso dos vírus constituídos por invólucro lipídico, por gemulação ou extrusão, não dependendo portanto da desintegração das células infectadas. (W. F. C. Ferreira et al. 2010)

1.5. Formas de transmissão e tipos de infecção viral

A transmissão de vírus entre indivíduos pode ocorrer de diversas formas, como por exemplo: transmissão fecal-oral, por aerossóis, por contacto directo com fômites ou produtos biológicos, por via sexual ou até por picada de vectores. Por seu lado, a sua replicação no ser humano, pode ser assintomática ou pode também causar patologias potencialmente graves. Além disso, uma infecção viral pode ainda ser ou não acompanhada de sintomas clínicos associados a doença. Assim, podemos definir 4 tipos principais de infecções virais, sendo elas:

- i. Infecção aguda – caracteriza-se por ser limitada a um número restrito de indivíduos e por uma recuperação rápida;
- ii. Infecções latentes – surgem quando os vírus não são eliminados eficazmente durante a fase da sua infecção primária, podendo permanecer no individuo, até á sua morte, como é o caso do vírus herpes simples.
- iii. Infecções virais crónicas – em que a replicação viral é mantida de forma contínua, pelo que é possível detectarem a presença de vírus nos indivíduos em qualquer altura, como por exemplo no caso do vírus da hepatite B.
- iv. Infecção lenta – em que a replicação do vírus é mantida por vários anos após um primeiro episódio de infecção aguda, resultando numa progressão lenta da doença.

II – REVISÃO TEÓRICA

1.1. NOVAS POSSIBILIDADES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Os progressos realizados na área dos anticorpos monoclonais a nível terapêutico facilitaram a identificação de alvos específicos e levou a estratégias de uso humano bem-sucedidas. Dezenas de novos anticorpos direccionados a actuar contra o HIV-1, *influenza*, vírus da hepatite C ou *sincicial respiratório*, entre outros, modificaram a estrutura base de uma nova vacina.

Outra área com enormes potencialidades no que diz respeito á industria farmacêutica é a possibilidade de gerar milhões de sequências de um produto genético, que permitiu identificar intermediários fulcrais no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, assim como a sequenciação do genoma dos próprios microrganismos, permitiu a selecção racional de alvos para o desenvolvimento de novas formulações. A título de exemplo podemos referir a vacina para o grupo B dos meningococos.

1.2. VÍRUS E TERAPIA

1.2.1. Vectores Virais

A utilização de vectores virais, acoplada á terapia génica consiste numa importante forma de combater doenças, como parkinson, hemofilia e distrofia muscular, por exemplo, que remonta ao final dos anos 70. A sua utilização baseia-se na inserção de um gene específico num alvo de um determinado organismo, podendo essa inserção ter como objectivos: substituir uma função que não esteja a funcionar correctamente; introduzir uma nova função (como por exemplo no tratamento do cancro) ou até para prevenir doenças (vacinas).

Os vírus, são microrganismos com uma conhecida capacidade de penetrarem células hospedeiras e aí iniciarem a sua replicação. Dada esta capacidade inata, são eles os

principais vectores utilizados neste tipo de terapia, destacando-se por exemplo os que derivam de *retrovirus*, *adenovirus* ou *herpes simples*.

Ora, se naturalmente os vírus necessitam de invadir o organismo e injectar o seu genoma numa célula hospedeira para se replicarem, é também natural que o sistema imune o detecte e active os mecanismos necessários para o eliminar. Assim, coloca-se a questão: de que forma se consegue contornar este problema? E de que forma, se garante que o vector consegue ultrapassar todas as barreiras biológicas e alcançar apenas as células doentes?

Na produção e desenvolvimento de vectores derivados de *adenovirus* ou *herpes virus*, um dos principais problemas, é que apenas se conseguiria expressar a quantidade suficiente para a replicação inicial do DNA viral, pois estes necessitam que lhes sejam fornecidas todas as proteínas estruturais. Por sua vez, na produção de vectores que derivam de *retrovirus*, são necessários dois componentes: o genoma do vector e as proteínas necessárias á sua replicação. (Bouard et al. 2009) Ambas as possibilidades estão rodeadas de limitações. Para além das limitações associadas à produção, outra questão que se levanta é o facto de os sistemas de produção de vectores, serem ainda insuficientes para conseguirem produzir quantidades suficientes para aplicações terapêuticas. Porém, não há dúvida que uma das grandes barreiras desta metodologia é o facto dos vectores virais terem de escapar á resposta imune, em especial por parte do sistema do complemento, bem como da parte de outros componentes da imunidade inata. Alguns progressos foram feitos na tentativa de contornar esta questão, especialmente pela introdução de vectores *helper*.

Relativamente ao tropismo celular, é uma questão que na terapia genética *in vitro*, não se revela problemática, uma vez que neste caso, as células-alvo são isoladas numa primeira fase, eliminando-se o risco de contaminação por falha ao atingir o alvo. Quando o processo se realiza *in vivo*, os riscos de se errar as células-alvo são elevados, podendo portanto o efeito terapêutico ficar comprometido, os efeitos secundários poderão alterar-se assim como a quantidade de vectores necessários poderá aumentar. Existem três formas principais de se realizar esse direccionamento (Figura 4). Uma das formas mais simples, mas também mais limitada de direccionar os vectores aos seus

alvos é basear o seu direccionamento no vírus precursor. A este direccionamento, poderão realizar-se pequenas modificações nomeadamente:

- i. Direccionamento directo: consiste na inclusão de um ligando á superfície do vector, que poderá promover a endocitose da membrana da célula facilitando a penetração do genoma do vector;
- ii. Direccionamento indirecto/inverso: ao se adicionar um ligando ao vector, inibe-se a entrada do vírus em células.
- iii. Direccionamento por proteases: em que pela inclusão de um substrato peptídico, se permite a clivagem da protease á superfície da célula alvo.

Outra forma possível de fazer o direccionamento é por uma técnica designada *pseudotyping*, que permite alterar a especificidade da ligação ora por alteração da cápside, ora por alteração das glicoproteínas da superfície de um vector. (Verhoeven & François-Loïc Cosset 2004) Igualmente, poderão utilizar-se adaptadores, com a capacidade de reconhecer, o vector por um lado e a célula-alvo, pelo outro.

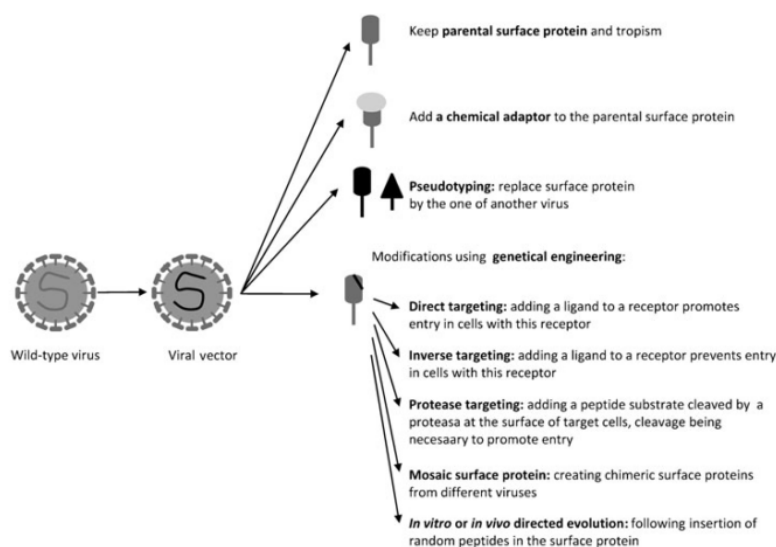


Figura 4 – Algumas opções de direccionamento dos vectores às células-alvo. Fonte: (Bouard et al. 2009)

Uma vez feita a transferência do gene, para o interior da célula-alvo e de modo a garantir um efeito terapêutico, é necessário que este gene seja expresso a um nível adequado. Esta expressão pode ser conseguida com o auxílio de promotores reguladores

entre os quais se destacam os promotores virais constitutivos, promotores induzidos, promotores tecido-específicos ou promotores endógenos. (Bouard et al. 2009)

Os promotores virais constitutivos, são frequentemente utilizados quando não é exigida uma expressão completamente regulada, como no caso das vacinas, em que o que realmente é necessário é uma fortíssima expressão do transgene (Bouard et al. 2009). O número de vacinas-vector tem vindo a aumentar sendo estas capazes de estimular a imunidade humoral e celular, através síntese de proteínas apresentadoras de antígenos às moléculas do complexo de histocompatibilidade. Além disso, vacinas que utilizam DNA e vectores virais mostraram-se eficazes em neutralizar anticorpos, produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro sempre que este, se sinta *ameaçado* por algum vírus. A título de exemplo, saliento o vírus *influenza*, pelo aumento da imunidade humoral e da resposta das células de memórias T-CD8.(Nabel 2013) Outro exemplo a salientar, é o sistema de regulação da transcrição das tetraciclinas, já testado em *retrovírus*, *lentivírus*, *adenovírus*, etc. Este sistema, é normalmente preferido, em detrimento de outros na terapia genica uma vez que a sua regulação se encontra bem estudada e por o seu indutor ser um conhecido e bem documentado antibiótico. Por outro lado, a utilização de promotores tecido-específicos é também bastante promissora, uma vez que permite uma maior especificidade no direccionamento á célula-alvo, e consequentemente uma diminuição dos efeitos secundários indesejáveis. Se por um lado, os vectores que derivam de *adenovírus* e *herpes* são considerados vectores de baixa expressão, pelo contrário os *retrovírus* são considerados de elevada expressão. No entanto, tal como proposto por alguns autores, uma expressão prolongada não é sinónimo da obtenção do efeito terapêutico, pois esta expressão não é sinónimo de um correcto direccionamento á célula-alvo. (Jager & Ehrhardt 2007)

i. Vírus como agentes terapêuticos

O ciclo de vida viral pode ser dividido em duas fases temporalmente distintas: infecção e replicação. A primeira, resulta da introdução do genoma viral na célula. Isto origina uma fase precoce de expressão genética, seguindo-se uma fase tardia, temática esta já discutida na secção 1.4 do capítulo I deste texto.

No caso de vectores na terapia genética, os vectores virais incorporam um gene terapêutico no lugar do genoma viral. Além disso, para que a terapia genética seja bem-sucedida é necessário, que uma quantidade suficiente de genes terapêuticos alcance o tecido-alvo. Dado, que esta temática, já foi também abordada anteriormente neste texto, interessa agora, centrar a nossa atenção, acerca da utilização de alguns vírus como veículos terapêuticos.

Os *Retrovírus*, são compostos por um invólucro lipídico, de cadeia simples. Após a penetração nas células-alvo, o RNA é transcrito em DNA de cadeia dupla, integrando a célula. São um tipo de vírus, que tendencialmente causam infecções crónicas, podendo em alguns casos causar também infecções latentes. Uma propriedade útil de vectores de *retrovírus* é a sua facilidade de integração na célula. Porém, embora esta integração não garanta uma expressão estável do gene, consiste numa forma efectiva de manter a informação genética num tecido auto-renovável, possibilitando assim a renovação das células. Recentemente, o cDNA da citocina γ foi traduzido nas células da medula óssea de crianças com imunodeficiência severa combinada. Os resultados foram, a recuperação do sistema imune por parte destas crianças, garantindo a sobrevivência num ambiente normal.

Os *Lentivírus*, são vectores promissores, ainda em fase de estudos pré-clínicos, no que respeita a terapia genética. No entanto, desde já se sabe que uma aplicação única destes vírus é no repovoamento de células hematopoiéticas. Os resultados mais promissores até ao momento, demonstraram eficácia em ratos com β -talassemia.

Os *Adenovírus*, foram primariamente utilizados no tratamento da fibrose cística, não tendo sido alcançados, no entanto resultados que demonstrassem a sua eficácia clínica. Mais recentemente, por sua vez, foram utilizados em ensaios clínicos associados ao tratamento do cancro. Esta utilização, deve-se essencialmente á sua capacidade de transferência genética, mas também porque a sua toxicidade celular e imunogenicidade podem realmente potenciar os efeitos anti tumorais.

Os *Adenovírus associados (AAV)*, são *parvovírus* humanos, que geralmente requerem um vírus auxiliar para mediar uma infecção. Alguns ensaios clínicos, com AAV, têm vindo a ser realizados, para o tratamento da fibrose cística, hemofilia e distrofia

muscular. Foram demonstradas evidências na transferência de genes e na expressão do factor IX de coagulação em pacientes com hemofilia B.

Os *Herpes Virus Simples*, são especialmente importantes, dada a sua capacidade de persistir no estado latente, após uma primeira infecção. Alguns estudos, têm vindo a ser realizados em animais, especialmente para o tratamento de cancro, doenças cerebrais, bem como no tratamento da dor, etc.

Assim, e considerando esta análise baseada na publicação de (Kay, M. A.; Glorioso & Naldini 2001), podemos aferir que os vectores virais aqui mencionados não são exclusivos, mas são de elevada importância. Além disso, nenhum vector viral isoladamente, é considerado suficiente para uma terapia genética de sucesso, porém, para situações específicas, poderão ser opções úteis a considerar.

1.2.2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos são das entidades biológicas mais abundantes, sendo utilizados com frequência em terapia. Além disso, os bacteriófagos têm algumas características que os tornam relativamente atractivos como agentes terapêuticos, ressaltando um vasto leque de benefícios relativamente aos antibióticos convencionais.

Tratam-se de vírus que infectam bactérias e utilizam maquinaria específica, para a multiplicação do seu próprio material genético. Poderão num futuro próximo, levar ao desenvolvimento de novos tratamentos mais económicos, bem como serem úteis para testes de diagnóstico.

A terapia com fagos, consiste na utilização das fases líticas dos fagos para tratar ou prevenir eventuais infecções bacterianas. Os fagos são altamente específicos e devido a essa especificidade, não são causados danos na flora normal. Ocorre a replicação no hospedeiro e facilita-se assim a efectividade do tratamento pela libertação inicialmente baixa, mas que vai sendo amplificada no local da infecção.

Por outro lado, tal como salienta o estudo de *Ian Connerton* no artigo (Gilmore 2012), os bacteriófagos são também potencialmente importantes como alternativas aos antibióticos convencionais, no controle de patogénios de origem alimentar, salientando-se em particular as espécies *Campylobacter*. Assim, os bacteriófagos desta espécie têm-se demonstrado de interesse, não só como agentes terapêuticos, mas também, em aplicações de higienização de alimentos em que os fagos são introduzidos directamente no alimento ou em fômites envolvidos nos processos de fabrico ou de empacotamento dos alimentos, minimizando assim a possibilidade de desenvolvimento de patogénios.

De modo semelhante, no mesmo artigo, *Marine Henry*, descreve investigações sobre o potencial uso de bacteriófagos como agentes terapêuticos, contra infecções pulmonares de *Pseudomonas aeruginosa*.

Outra aplicação potencial, é a referida por *Jakub Barylski*, que vai mais longe e centra-se na efectividade da destruição das membranas de biofilmes. Este investigador, isolou um bacteriófago, que levou ao conseqüente isolamento de duas enzimas. Acredita-se, que estas enzimas: *poly- γ -glutamate* e *polysaccharide lyase*, estejam envolvidas na degradação inicial da cápsula para além de serem úteis no rompimento da matriz do biofilme.

De facto, a emergência das resistências aos antibióticos, tem vindo a tornar-se crítica, Assim, a necessidade de “reformular” os antibióticos e de oferecer novas opções tornou-se uma prioridade, daí muitos investigadores terem vindo a centrar as suas investigações sobre bacteriófagos e especialmente sobre as suas potencialidades terapêuticas.

Tal como já foi referido, os bacteriófagos consistem em vírus que invadem e infectam bactérias. Os bacteriófagos foram oficialmente descobertos por Felix d’Herelle no início do século XX, tendo este produzido comercialmente pela primeira vez em Paris. Mais tarde, em 1940, nos Estados Unidos, produziram-se e desenvolveram-se comercialmente sete bacteriófagos, entre os quais se destacam os de aplicação humana, contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Esherichia coli*, entre outros. Estas preparações eram essencialmente utilizadas contra doenças como por exemplo vaginites, infecções crónicas do tracto respiratório ou até abscessos. Porém, a eficácia destes bacteriófagos foi na época, controversa, tendo estes, aliados ao rápido desenvolvimento dos

antibióticos caído em desuso por alguns anos.(Sulakvelidze et al. 2001) Apesar disso, acabaram por se manter em uso na Europa de Leste e têm vindo a reaparecer por toda a Europa.

Tal como já referi, o crescente número de resistências a antibióticos, possibilitou a redefinição das terapêuticas mais actuais, e veio ressaltar o interesse dos bacteriófagos na terapêutica. Existem numerosas publicações disponíveis acerca do uso de bacteriófagos, mas poucas, salientam o seu mecanismo de acção ou aspectos relacionados com o seu perfil de segurança, ou seja, acerca de parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos, entre outros.

De um modo geral, assume-se que os fagos, infectam bactérias pela sua replicação e lise no interior das células. Porém, estudos recentes, têm revelado diferenças nos ciclos de replicação, conforme se tratem de fagos líticos ou lisogénicos. Além disso, concluiu-se também que no caso de se tratar de um fago lítico, o processo da lise bacteriana se baseia numa cascata complexa de eventos, envolvendo genes estruturais e regulatórios.

As diferenças entre os ciclos de replicação dos fagos líticos e lisogénicos encontram-se sumariadas na figura seguinte (5).

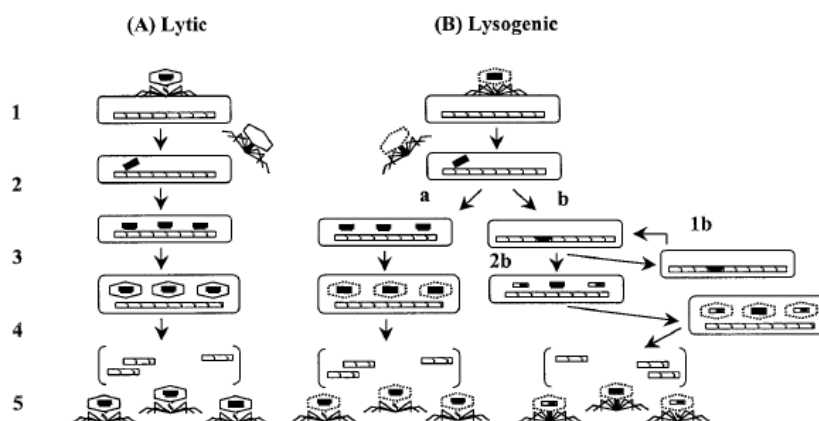


Figura 5 – Ciclos replicativos de fagos líticos (A) e lisogénicos (B) Fonte:(Sulakvelidze et al. 2001)

Relativamente aos fagos líticos, começa por ocorrer uma ligação (1); seguindo-se a introdução do DNA do bacteriófago na bactéria hospedeira (2); na etapa (3) ocorrem uma série de eventos sucessivos, nomeadamente: inibição da síntese bacteriana,

replicação do DNA do fago; (4) montagem dos fagos; e finalmente na última etapa (5) há libertação dos fagos maduros e consequente lise.

Quanto aos fagos lisogénicos, podemos referir que as etapas (1 e 2) são bastante semelhantes às anteriormente citadas; (3) a terceira etapa, consiste no início de um ciclo replicativo semelhante ao que ocorre com os fagos líticos (a) ou integrar o DNA no cromossoma da bactéria hospedeira (b). Na etapa (1b) ocorre multiplicação celular por várias gerações, enquanto na fase (2b) ocorre indução lisogénica, (que pode ser espontânea ou ser fruto de indução por radiação ou elementos carcinogénicos), em que simultaneamente há excisão do DNA do fago para o exterior da célula hospedeira.

Em suma, os bacteriófagos têm determinadas características, que os tornam potenciais agentes terapêuticos. Entre estas, salientam-se a sua elevada especificidade e alta efectividade na lise bacteriana, cujos mecanismos de acção se encontram sumariados na figura anterior. Além da sua especificidade e efectividade, tal como é referido por (Sulakvelidze et al. 2001) os bacteriófagos são agentes terapêuticos considerados seguros e que permitem ser adaptados e modificados, para um rápido tratamento das emergentes infecções bacterianas.

1.2.3. Vacinas

A vacinação é um dos métodos disponibilizados pela indústria farmacêutica, mais efectivos na protecção de populações contra doenças infecciosas. Desde que Edward Jenner, testou pela primeira vez em 1776 a vacina contra a varíola com sucesso, que as vacinas se assumiram de elevada importância na erradicação de doenças infecciosas. Actualmente, existem mais de 70 vacinas nos mercados mundiais que conferem protecção apenas contra cerca de 30 microrganismos, dos milhares conhecidos (Fig.6).

O sucesso das vacinas, deriva não só da identificação e desenvolvimento de vacinas realmente efectivas, mas também pelo facto destas representarem uma das formas mais baratas e eficientes de conferir protecção e imunidade contra microrganismos conhecidos. Além disso, advêm do seu uso benefícios económicos oriundos da

prevenção da hospitalização e evitando paragem por doença das populações profissionalmente activas.

Apesar disto, a indústria ainda não conseguiu alcançar o potencial absoluto das vacinas por variadíssimas razões, sejam elas: económicas, políticas ou porque existem vírus como por exemplo os do HIV ou dengue, para os quais ainda não se conseguiu desenvolver uma fórmula que mimetize uma resposta imune protectora. Este ultimo aspecto, está intimamente relacionado com a capacidade tecnológica de desenvolvimento de *novas* vacinas.

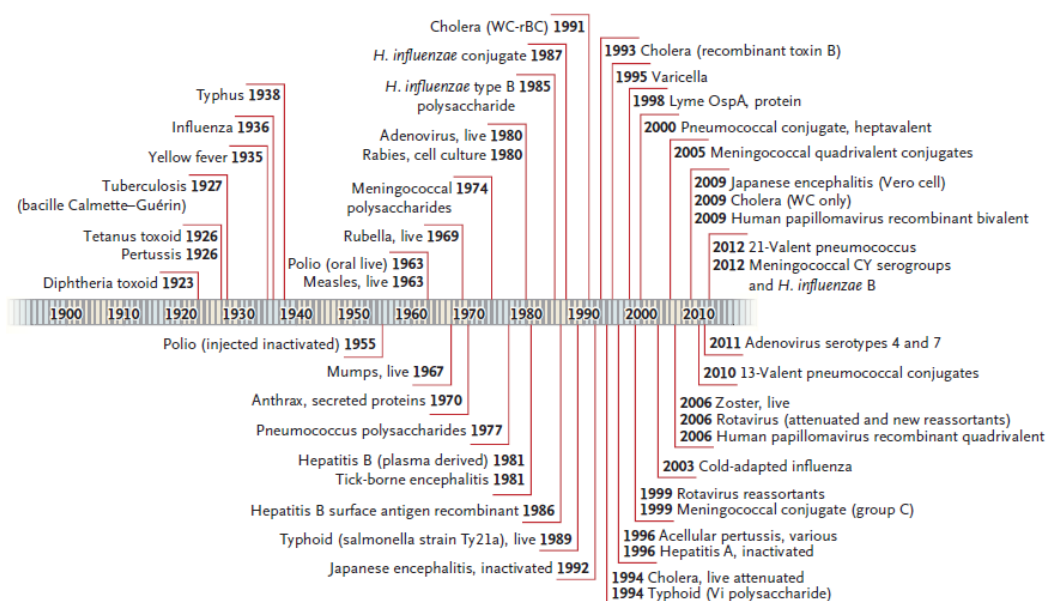


Figura 6 – Linha temporal representativo das vacinas em uso comercial. Fonte: (Nabel 2013)

i. Novos Avanços Científicos na Era das Vacinas

Não há dúvida de que os anticorpos são o denominador comum numa vacina eficaz e capaz de neutralizar um microrganismo. De facto, o conhecimento actual sobre a estrutura molecular das glicoproteínas virais, mecanismo de entrada na célula hospedeira e a sua forma de interacção com os supra referidos anticorpos, permitiram á indústria desenvolver formulações com a capacidade de neutralizar microrganismos, evitando doença.

Ter amplos conhecimentos acerca das zonas de susceptibilidade dos agentes á inactivação por anticorpos, é um ponto fulcral para o desenvolvimento de formulações eficazes. Salientam-se por exemplo os vírus HIV-1 e *influenza*. Relativamente ao HIV-1, após a análise do seu invólucro foram descobertos pelo menos 4 locais: *local de ligação ás células CD4, locais de glicosilação; regiões variáveis 1 e 2 (V1V2), e polissacarídeos da região externa da membrana proximal*” (Nabel 2013) que se apresentam como alvos potenciais para imunogenicidade. Assim, avanços recentes na procura de uma vacina para o HIV, permitiram identificar um excelente poder de neutralização nestes locais *“Alguns anticorpos monoclonais neutralizam mais de 90% dos resíduos virais, apresentando-se assim como uma nova oportunidade no desenvolvimento de novas vacinas para o HIV”* (Nabel 2013). Quanto ao *influenza*, progressos semelhantes foram alcançados com a identificação de duas regiões susceptíveis: *“uma na região da haste viral que ajuda a estabilizar o trímico, e outra na região de ligação ao receptor que reconhece o ácido siálico”* (Nabel 2013) Assim, poderá vir a ser possível conseguir obter-se as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de vacinas universais contra o vírus *influenza*.

Além de ser importante conhecer as zonas de susceptibilidade dos vírus, interessa também conhecer em profundidade a estrutura molecular dos mesmos. Enquanto alguns vírus mantêm a sua conformação estável, ao longo do ciclo de infecção, outros, como por exemplo o HIV, adquirem variadas formas, perdendo desta forma os anticorpos, a sua especificidade de ligação.

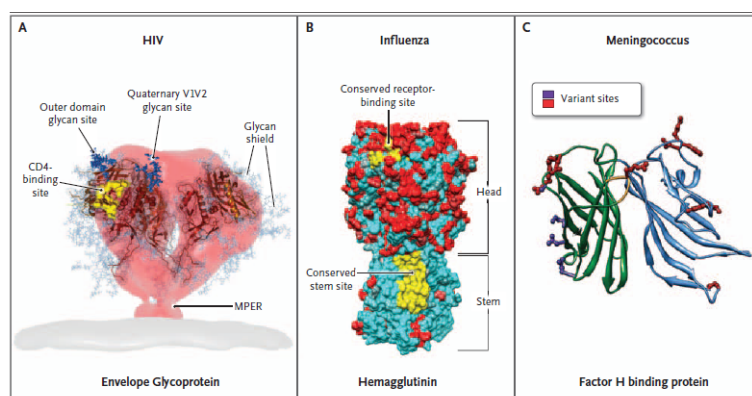


Figura 7 – Mecanismos pelos quais as glicoproteínas virais medeiam a sua entrada na célula hospedeira. (A) HIV; (B) Influenza; (C) Meningococcus. Fonte: (Nabel 2013)

Para se conseguir modelar a resposta imune, é fulcral a apresentação de antígenos específicos ao sistema imune. Neste processo, as células dendríticas têm um papel fundamental. Tradicionalmente as vacinas baseavam-se em organismos vivos atenuados ou inactivados, cápsulas ou toxinas inactivas. Actualmente, progride-se na tentativa de alcançar uma resposta imune baseada na morfologia das células dendríticas e da sua resposta aos adjuvantes.

Em suma, se por um lado Jenner, foi bem-sucedido ao criar uma vacina eficaz com uma simples observação, por outro, existem ainda microrganismos que causam infecções como HIV ou malária, para as quais ainda não se alcançou uma forma 100% efectiva de proteger as populações. As vacinas do futuro, deverão por isso, centrar a sua atenção em mimetizar ou até suplantar a resposta imune natural, criando uma resposta imune artificial, sendo isto eventualmente possível de ser alcançado, pela identificação de alvos susceptíveis, pelo conhecimento das variadas conformações que o vírus poderá tomar ao longo da infecção e ainda pelo desenvolvimento de novas técnicas e esforços por parte das entidades competentes.

III – NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

1.1. BIOTECNOLOGIA

A biotecnologia pode ser definida como: “a aplicação dos princípios científicos e da engenharia ao processamento de materiais, através de agentes biológicos, para prover bens e assegurar serviços.”(Glick BR and Pasternak JJ, 2003)

O termo biotecnologia, foi utilizado pela primeira vez em 1919 por Karl Ereky. Porém, foi na década de 70, aliado a descoberta das técnicas de DNA recombinante e de hibridoma, que a biotecnologia apresentou o seu desenvolvimento exponencial.

Os processos biotecnológicos são cada vez mais diversificados. E sem dúvida, a área da saúde tem sofrido bastantes desenvolvimentos. Um exemplo a ressaltar é a utilização de vírus que infectam plantas como sistemas de libertação de fármacos. Estes são, actualmente, vectores atractivos para uma libertação de fármacos mais direccionada e orientada. Como exemplos, é possível referir, o milho ou até a planta do tabaco cuja é frequentemente infectada pelo vírus do mosaico do tabaco. (K. E. Stein & Webber 2001)

Sem dúvida, muitos produtos naturais, como plantas, microrganismos ou os seus metabolitos têm sido considerados importantes no tratamento contra doenças humanas, como cancro ou infecções virais ou bacterianas. A aplicação da bioengenharia a plantas, para a produção de produtos biológicos para uso humano e animal, tem sofrido importantes desenvolvimentos ao longo dos últimos anos. Um exemplo importante, é a utilização de tomates ou batatas, como hospedeiros, quando o produto final é uma vacina comestível. (K. E. Stein & Webber 2001) Paralelamente, no que respeita aos microrganismos salientam-se as *myxobacterias*, em que embora se desconheçam ainda as razões pelas quais este tipo de bactérias dispõem de um leque tão diversificado de metabolitos, é considerado que estas conferem vantagens competitivas podendo ser usadas na modulação célula-célula e tornarem-se assim poderosas armas clinicas.

Paralelamente a esta complexidade química questiona-se por que razão estes metabolitos secundários são tão activos contra doenças humanas? A resposta, passa pela conclusão de que existe uma conservação funcional de elementos virais e celulares entre os diversos reinos e os grupos de vírus, sendo portanto estes importantes para o desenvolvimento de novos fármacos anti-virais (Diez et al. 2012).

1.2. APTAMERS E A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-VIRAIS

Historicamente, a indústria farmacêutica centra-se na descoberta de novas moléculas orgânicas. Porém em média, é necessário sintetizar cerca de 10000 compostos até se descobrir uma nova substância activa com interesse para desenvolvimento. Em suma, a descoberta de novos fármacos é um processo longo, caro, difícil e ineficiente. Uma forma que a indústria tem de diminuir custos e aumentar a eficácia é descobrir e desenvolver fármacos não tradicionais, como anticorpos e ácidos nucleicos. Neste contexto, revelam-se de interesse os *aptamers*.

Aptamers, são moléculas de ácidos nucleicos seleccionados *in vitro*, que têm elevada afinidade e especificidade para um elevado leque de alvos. O processo de isolamento designa-se de SELEX e têm como princípio básico de funcionamento a utilização de ácidos nucleicos seleccionados aleatoriamente, dos quais se isolam e enriquecem ligandos.

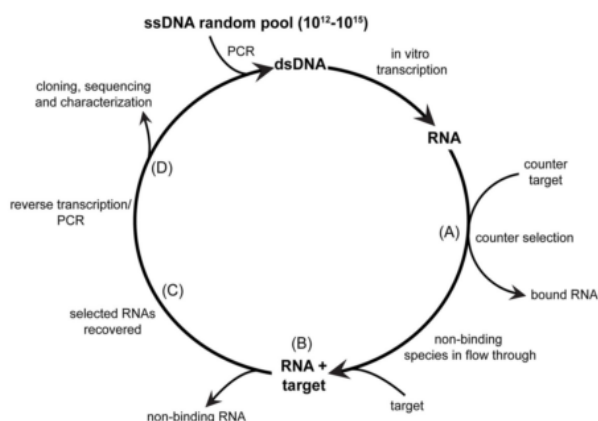


Figura 8 – Processo SELEX. Fonte: (Binning et al. 2012)

Ocorre a transcrição inicial de dsDNA *in vitro*. O fragmento resultante de RNA é sujeito (A) a uma selecção inicial e/ou (B) a uma selecção por ligação a um filtro. (C) O RNA seleccionado é recuperado, sujeito a transcrição reversa e amplificado por PCR. (D) Por fim o RNA resultante é sujeito a um novo ciclo de SELEX para enriquecimento ou clonagem e sequenciação.

Existem variadas estratégias de isolamento *in vitro*, para a gerar *aptamers* para diversos alvos: desde *aptamers* que se ligam a alvos com poucos átomos, até *aptamers* que se ligam a macro-moléculas ou até células ou vírus. De uma forma geral, a maior parte dos *aptamers* identificados consistem em moléculas de DNA ou RNA de cadeia simples contendo entre 20 a 90 bases. Os *aptamers* são muitas vezes comparados com anticorpos, dada a sua elevada especificidade. Porém, os primeiros têm inúmeras vantagens relativamente aos anticorpos, das quais se destacam por exemplo a facilidade da sua obtenção, a sua baixa imunogenicidade bem como, a elevada estabilidade e biodisponibilidade que estes apresentam *in vivo*. Para uma geração de *aptamers* mais eficiente, pode acoplar-se o método de SELEX, com outras técnicas, como por exemplo: electroforese de capilaridade ou ressonância plasmónica de superfície, permitindo-se assim reduzir o período necessário para a descoberta de um novo *aptamer* para um alvo particular assim como, aumentar o seu tempo de vida no soro. A título de exemplo, podemos referir por exemplo o fármaco *pegaptanib*³, aprovado em 2004 pela FDA. (Binning et al. 2012) Uma vez que as interacções entre ácidos nucleicos e proteínas são fulcrais para a replicação viral, conseguimos perceber o interesse que a geração de novos *aptamers* poderá ter na construção de novas moléculas para o ataque a vírus.

³ *Pegaptanip*, é um fármaco baseado em aptameros utilizado para o tratamento da degeneração muscular relacionada com o envelhecimento.

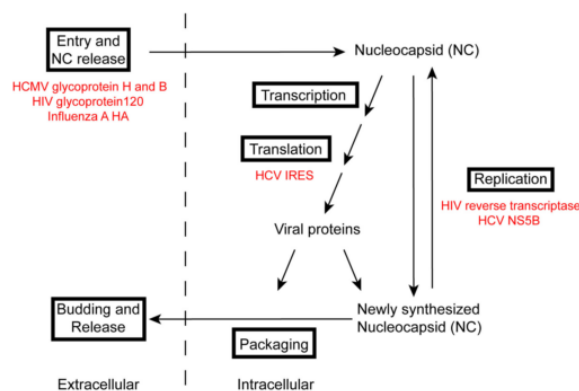


Figura 9 – Passos fundamentais do ciclo viral como alvos para o desenvolvimento de aptameros. Fonte: (Binning et al. 2012)

Exemplos de proteínas virais ligadas a *aptamers* apresentam-se identificados a vermelho.

Assim, os *aptamers* apresentam-se como uma alternativa viável para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra infecções virais, podendo ser usados para inibir a infecção em qualquer fase da replicação viral, incluindo na fase de entrada, que se revela de enorme importância para prevenir a infecção por si só. Como exemplos, salienta-se por exemplo o desenvolvimento de *aptamers* contra o HIV, HCMV ou HCV.

No caso do HIV-1, o objectivo passa por direccionar a entrada do HIV nas células T-helper. Os *aptamers* gerados contra a glicoproteína 120 (gp 120), competem com o co-receptor CCR5. O local de ligação do *aptamer*, localiza-se numa região conservada da gp120. Desta forma, obtém-se a neutralização do HIV isolado pela interrupção da interacção gp120-CCR5. (Binning et al. 2012) Neste âmbito, é também sabido que os *aptamers* cujo alvo é a HIV-RT, inibem a síntese de cDNA. O ligando 1.1 do *aptamer* da HIV-RT, revelou-se assim importante na medida em que permitiu a diminuição dos efeitos secundários de fármacos como AZT (3'- ácido 3' dioxitimidina) ou dideoxinosina, utilizados nesta infecção.

Quanto ao HCMV, foram isolados dois *aptamers* (L13 e L19), que inibem a formação e crescimento de uma lesão maligna. Assim, a actividade antiviral dos *aptamers* supra mencionados permitiram a identificação das glicoproteínas B e H, respectivamente, como alvos, bloqueando-se assim a entrada do vírus.

Finalmente, relativamente ao HCV, as RNA polimerases têm sido um alvo comum. A proteína não estrutural 5B é fundamental para a transcrição do genoma do HCV e é necessária para gerar tanto os *aptamers* anti-5B RNA como os de DNA. O mecanismo de inibição da anti-5B RNA é não competitivo e apenas um *aptamer* anti-5B DNA inibe a replicação por competição com o modelo de RNA.

Em suma, ao contrário dos anticorpos que derivam de animais e linhas celulares, os *aptamers* são seleccionados de processos *in vitro*, garantindo-se assim a baixa imunogenicidade. Além disso, qualquer molécula biológica poderá ligar-se a *aptamers*, começando estes últimos a ser cada vez mais preferidos quando comparados com os anticorpos, no diagnóstico⁴ de uma amplo leque de doenças, como cancro, doenças tropicais ou HIV. Assim, *aptamers*, são frequentemente utilizados devido á sua flexibilidade e facilidade de manipulação, no desenvolvimento de agentes de imagem e diagnóstico, salientando-se por exemplo a sua utilização como radio-fármacos. (C. S. M. Ferreira et al. 2007)

1.3. TECNOLOGIA ANTISENSE

A tecnologia *Antisense*, consiste num tipo de terapia genética baseada na produção de cadeias simples de DNA e RNA, designadas por *oligonucleótidos antisense*, sendo utilizados para minimizar os efeitos resultantes da expressão exacerbada de genes causadores de doenças.

Os *oligonucleótidos antisense* são obtidos por síntese química, apresentando uma sequência específica, capaz de se ligar ao DNA ou mRNA em locais específicos. Ou seja, o objectivo final da tecnologia *antisense*, é a prevenção da expressão de um gene particular, através do bloqueio da transcrição ou da tradução.(Besseling et al. 2013)

⁴ Sendo esta capacidade conseguida por exemplo com modificações básicas na técnica de ELISA.

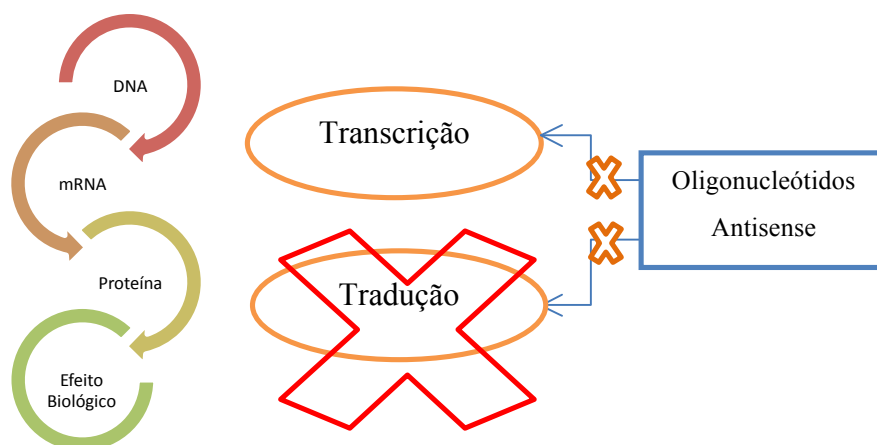
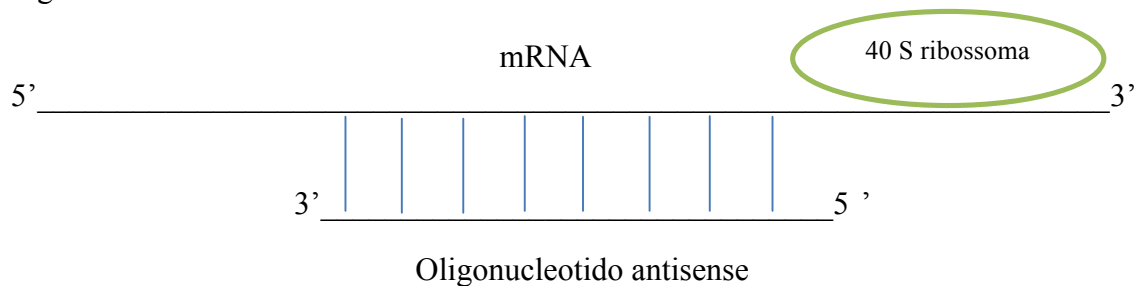


Figura 10 – Esquema representativo do funcionamento da tecnologia antisense.

O uso de oligonucleótidos como inibidores selectivos da expressão genética, facilita novas técnicas de prevenção e tratamento de doenças envolvendo genes, ou seja, com esta técnica é possível bloquear a expressão de genes específicos envolvidos em patologias também elas específicas. Assim, esta tecnologia tem sido alvo de investigação em diferentes campos, nomeadamente: oncologia, hematopatologia bem como e de maior interesse neste caso, infecções víricas.

Os oligonucleótidos *antisense*, de agora em diante designados de ODNs, consistem em cadeias curtas de DNA, compostas entre 12 a 30 nucleótidos, complementares a um mRNA. A tradução pode ser bloqueada, ora por um mecanismo activo ora por um mecanismo passivo. No último, resulta da hibridização entre o mRNA e a sequência nucleotídica exógena, inibindo-se assim a leitura da mensagem pelos ribossomas. Relativamente ao mecanismo activo, ocorre a formação de um substrato que permite a ligação á RNase⁵, destruindo-se o RNA, mas deixando intacto o oligonucleótido para hibridar com outro mRNA. Os dois mecanismos encontram-se sumariados na figura seguinte:



(A)

⁵ RNase – enzima que reconhece e destrói selectivamente a porção de RNA do mRNA–ODN híbrido.

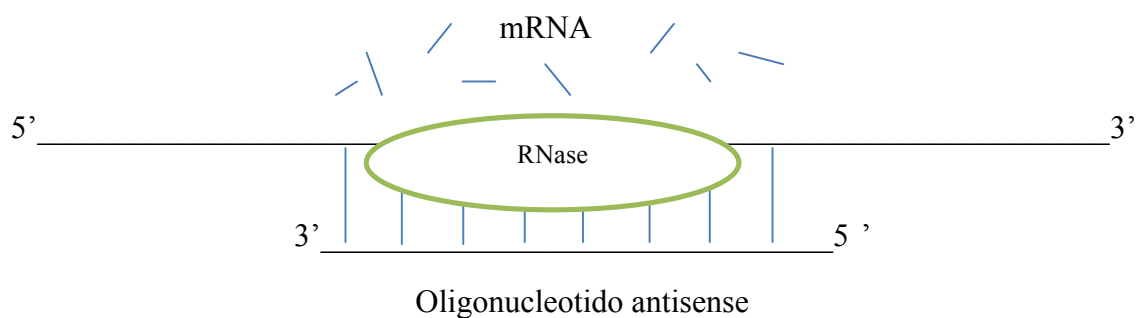
**(B)**

Figura 11 – (A) Mecanismo passivo. (B) Mecanismo activo.

Outra questão importante a ressaltar nos oligonucleótidos é que estes são susceptíveis de sofrerem danos por endonucleases. Assim, ao longo dos anos, têm-se desenvolvido também, algumas modificações, de modo a que estes se tornem mais resistentes à acção destas enzimas e consequentemente lhes permitam atingir os seus alvos intracelulares mais eficazmente. Das modificações mais importantes, salientam-se por exemplo, a substituição de um O₂ por um átomo de enxofre, no grupo fosfato. Outra possibilidade, é os oligonucleótidos conterem duas ou mais regiões quimicamente distintas. Esta e outras substituições possíveis, conferem aos ODN's uma maior resistência às endonucleases, uma maior captação por parte das células bem como uma maior afinidade para o alvo de RNA. (Galderisi et al. 1999)

Relativamente à captação dos ODN's por parte das células, vários estudos *in vitro*, têm vindo a ser realizados. De todos eles, o método que demonstrou ser mais eficaz *in vitro*, baseia-se no uso de lípidos catiónicos para o revestimento dos ODN's. Desta forma, as moléculas formam complexos com os ácidos nucleicos aniónicos, conferindo-lhes protecção contra a degradação enzimática. Assim, o complexo formado fica com carga positiva á sua superfície, possibilitando-se uma melhor ligação á membrana celular, que é carregada negativamente. Posteriormente, o complexo é “sugado”, por endocitose. (Dias & C. A. Stein 2002)

A terapia *antisense*, tem emergido como potencial agente terapêutico em diversas patologias, das quais se ressaltam o cancro ou patologias cardiovasculares. Além disso, os ODN's têm também emergido como eficazes agentes anti-virais.

O VIH, vírus da deficiência humana imunoaquirida, é repleto de variações tanto nas cadeias do próprio vírus como das partículas virais. Além disso, os tratamentos disponíveis usados para o tratamento ou alívio dos sintomas, causam diversos efeitos secundários indesejados. Paralelamente a estes factos, a tecnologia *antisense*, coloca a possibilidade de inibir a expressão e replicação viral. Esta inibição, poderá ser alcançada pela ligação a locais de RNA virais que sinalizam a síntese de proteínas conservadas do VIH, com especial destaque para a proteína p24. Paralelamente ao HIV, também a infecção por HBV, cujo o único tratamento disponível passa pela administração de interferão, se demonstrou de interesse. A descoberta de vírus animais, relacionados com o HBV, contribuiu positivamente para o desenvolvimento de novas terapias para infecções crónicas. Estes novos modelos terapêuticos baseiam-se no direccionamento dos oligonucleotidos *antisense* para a região 5' do pré-gene DHVB, cujo demonstrou *in vitro* e em patos, inibir a replicação e expressão genética.(Galderisi et al. 1999)

Para terminar, gostava apenas de me referir também ao primeiro fármaco, baseado na tecnologia *antisense*. O Vitravene®, foi o primeiro fármaco baseado nesta tecnologia, aprovado pela FDA em 1998. É um fármaco indicado no tratamento contra infecções de *citomegalovirus*, em doentes com HIV, em que os outros tratamentos se demonstraram ineficazes. Muito sucintamente, consiste num oligonucleotido, desenhado para bloquear a replicação do HCMV humano, segundo uma tecnologia *antisense*.

1.4. DRACO: DOUBLE-STRANDED RNA ACTIVATED CASPASE OLIGOMERIZER

Todos os anos, milhões de pessoas em todo o mundo, apesar dos enormes avanços da medicina, morrem devido a infecções causadas por vírus.

Isto, faz-nos colocar uma questão: ora se existem antibióticos de largo espectro capazes de curar muitas infecções bacterianas, por que razão, não sucede o mesmo em relação aos anti-virais?

Os vírus, para além de biologicamente diferentes das bactérias, possuem ainda diferentes mecanismos de infecção celular, necessitando assim de um agente farmacológico diferente na sua destruição. DRACO, “é uma super proteína, capaz de erradicar infecções víricas”. (Rider et al. 2011)

Ao contrário das outras opções disponíveis contra vírus, como vacinas e terapias anti-virais que são específicos, *DRACO*, consegue actuar quase contra todos os tipos de vírus, sendo portanto muitas vezes comparado à penicilina, mas no que respeita a vírus.

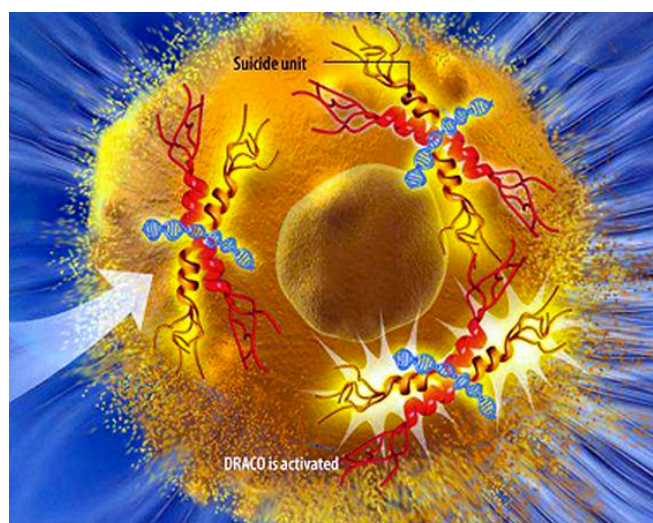


Figura 12 – Mecanismo de actuação do DRACO. Fonte:(www.theairspace.net.)

Criado por Todd Rider juntamente com uma equipa de investigadores do Massachusetts Institute of Technology, DRACO, sinónimo de Double-stranded RNA Activated Caspase Oligomerizer, é assim designado devido ao seu mecanismo intracelular de acção, em que não só os vírus são rapidamente reconhecidos, mas também forçados a cometer apoptose. Esta questão é de elevada importância, dado que os vírus dependem maioritariamente de células hospedeiras para completarem o seu ciclo reprodutivo.

Uma vez no sistema, DRACO reconhece a presença de RNA de dupla cadeia (dsRNA), sendo atraído para células que estejam a expressar dsRNA. Por um lado, o genoma de muitos vírus é composto por dsRNA, por outro, os vírus têm a capacidade de converter a célula hospedeira de DNA em dsRNA, de modo a garantir a sua inserção na célula e facilitar a sua replicação. Assim, quando dois ou mais DRACO's reconhecem uma dupla cadeia de RNA viral, promove-se a libertação de uma enzima (caspase), que

obriga a célula hospedeira a cometer apoptose. Para além disto, foi considerado como não tóxico em 11 espécies de mamíferos. Mas mais importante ainda, é o facto de ter permitido curar infecções virais de 15 diferentes tipos de vírus entre os quais destacamos: *rhinovírus* (gripe comum), H1N1 (gripe suína) e *adenovírus* (infecções respiratórias).

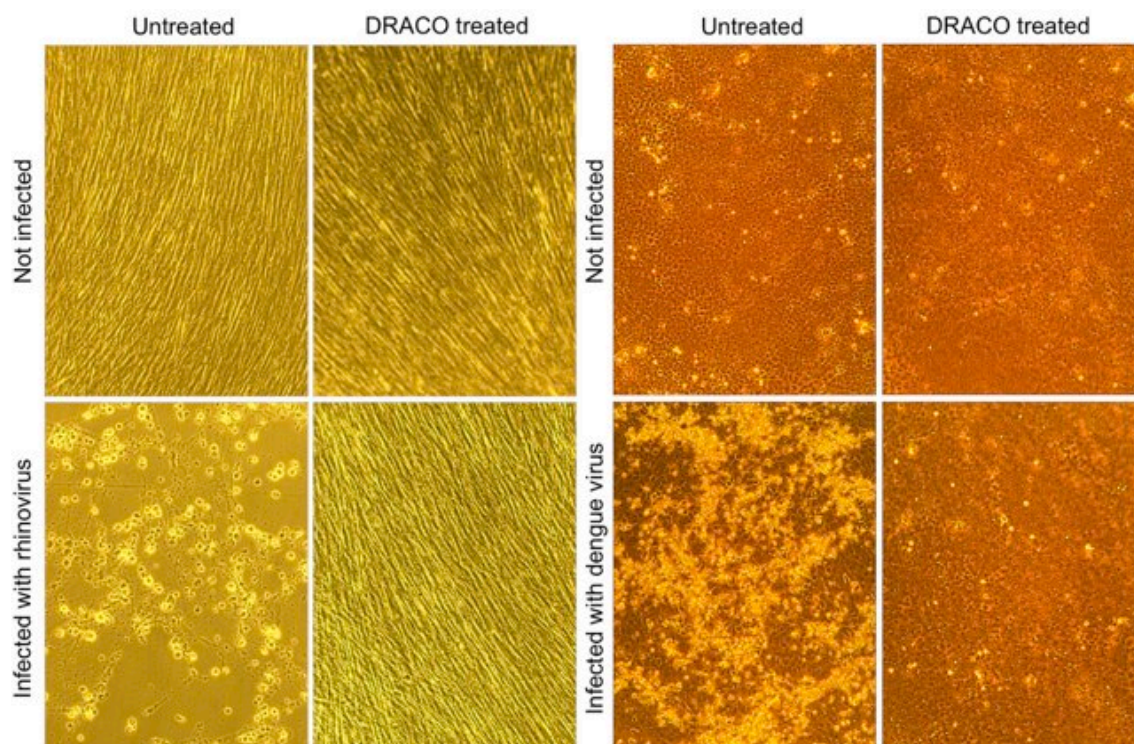


Figura 13- Figura representativa da efectividade do DRACO contra dois tipos de vírus. Fonte: (www.theairspace.net)

Deste modo e em síntese, podemos afirmar que o DRACO se assume no âmbito da virologia, como um *anti-viral de largo espectro*, paralelamente ao que sucede no âmbito da bacteriologia com a penicilina.

1.5. UM CASO DE ESTUDO: DPOC

A DPOC, ou doença pulmonar obstrutiva crónica pode ser definida como “...uma doença caracterizada por uma persistente limitação de fluxo de ar ...”(www.goldcopd.org).

A DPOC, é uma causa de elevada morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. Porém, as terapias comumente aplicadas, acabam por se demonstrar insuficientes, não só pelo fornecimento incompleto de ar, mas também por não eliminarem em definitivo as reacções exacerbadas.

Assim, novas terapias têm vindo a ser estudadas, com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, assim como de prevenir eventuais crises.

Na fase final deste texto, em que se tentou fazer um apanhado sobre a forma como os vírus podem simultaneamente ser microrganismos infecciosos e patogénicos para o homem, bem como, poderão também ter efeitos benéficos no tratamento de inúmeras patologias ou na diminuição de efeitos colaterais associadas, poderia ter optado por diversas temáticas, entre elas, HIV, LPS's (lipossacarídeos) ou até o tão conhecido vírus influenza. No entanto, optamos por abordar com maior detalhe os desafios relacionados com o desenvolvimento de novas terapias, para a DPOC – uma doença, infelizmente tão frequente e simultaneamente tão pouco lembrada às populações.

O *rinovírus*, é responsável pela maioria das infecções do tracto respiratório superior, podendo tornar-se contagioso, entre duas pessoas, por intermédio das secreções. Diversos estudos, demonstraram ainda que ocorre uma indução dos genes mediadores da inflamação, com activação dos neutrófilos, após a infecção das células epiteliais brônquicas. Após a infecção, há libertação de citocinas como a IL-6 e a IL-8. As citocinas, atraem células inflamatórias, que por sua vez libertam produtos tóxicos e conseqüentemente originam danos no tecido pulmonar. (Van der Merwe & Molino 2012)

Neste âmbito, vários estudos centrados em investigar as causas da inflamação, concluíram, que os vírus em geral e os *rinovírus* em particular são os principais responsáveis pela reacções exacerbadas de inflamação. Assim, vários estudos foram realizados, na tentativa de perceber a influência destes vírus, tendo-se observado em todos um aumento estatisticamente não significativo, das IL-6 e IL-8, bem como dos sintomas associados: constipação, gripe, diminuição do fluxo de ar e aumento dos neutrófilos a nível sanguíneo. Embora, todos estes estudos não permitam estabelecer conclusões, com base em dados estatísticos concretos, permitiram no entanto, perceber

o processo molecular e inflamatório, envolvido na DPOC associada a vírus. Finalmente, estes estudos, têm também demonstrado ser importantes ferramentas pré-clínicas e clínicas na investigação e desenvolvimento de novos alvos farmacológicos, por parte das indústrias farmacêuticas.

IV – CONCLUSÕES

Os vírus são microrganismo, alguns deles complexos, cujas propriedades e características têm vindo a ser estudadas com o intuito de descobrir novas aplicações para a indústria farmacêutica. Consistem em microrganismos, que dependem do hospedeiro para replicarem, ou seja, são parasitas intracelulares obrigatórios com capacidade de causar infecção em variados domínios. A sua classificação pode ser variada, nomeadamente, quanto: á sua estrutura, características bioquímicas, doenças, modos de transmissão, célula hospedeira, etc. No entanto, a classificação mais comum e consensual no mundo científico, consiste na classificação de Baltimore, que basicamente distingue os diferentes tipos de vírus conforme as estruturas de transcrição dos genomas virais sejam por exemplo: DNA de cadeia dupla, linear ou circular (grupo I) ou por exemplo RNA de cadeia dupla (grupo III). Porém, além disso, poderão ainda ser classificados relativamente á sua composição ou morfologia.

Para conseguirmos entender os vírus como máquinas ao dispor da indústria farmacêutica, ressalta de interesse definir as etapas gerais do ciclo de replicação viral. Este ciclo, é comumente dividido em quatro fases importantes. Na primeira, *adsorção*, ocorre uma interacção importante entre o virião e a célula-alvo, para que o vírus consiga introduzir o seu genoma. Segue-se a *penetração*, que sucintamente consiste na introdução do ácido nucleico na célula hospedeira, que por sua vez, culmina com a *descapsidação*, que se baseia na desintegração completa das partículas virais e consequente libertação do genoma. Para terminar, ocorre a fase de biossíntese, que se baseia na produção de novas proteínas virais e replicação dos seus genomas.

Após este enquadramento inicial, optamos por realizar uma pequena revisão teórica acerca das novas possibilidades da indústria farmacêutica. Entre estas, salientam-se os recentes avanços na utilização de vectores virais ao serviço da indústria e da medicina, salientando a técnica de *pseudotyping*, como uma opção efectiva de direccionamento dos vectores às células-alvo e referindo, a título de exemplo alguns vírus como agentes terapêuticos. Destes últimos, salientam-se por exemplo a utilização de *Retrovírus*, em pacientes com imunodeficiência severa combinada, tendo-se alcançado a recuperação

dos seus sistema imune. Salientam-se também os *Adenovirus* ou os *Adenovirus associados*, em que os últimos, geralmente requerem um vírus intermediário ou auxiliar, na mediação da infecção. Ao dispor da indústria, encontramos também as vacinas com os recentes avanços a elas associados e os bacteriófagos, que basicamente, são vírus que infectam bactérias cuja utilização como agentes terapêuticos, se tem revelado bastante atractiva.

Para terminar, optou-se por prosseguir esta análise, numa perspectiva mais orientada para a biotecnologia e as novas ferramentas que esta oferece á industria. Neste âmbito, revelou-se de interesse, centrar a atenção sobre *Aptamers*, Tecnologia Antisense e Tecnologia DRACO.

Aptamers, são moléculas de ácidos nucleicos seleccionados *in vitro*, que têm elevada afinidade e especificidade para um elevado leque de alvos, seleccionadas aleatoriamente por um processo designado SELEX. São uma alternativa útil para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra infecções virais, uma vez que podem inibir a infecção em qualquer fase da replicação viral. De todos os desenvolvimentos alcançados até ao momento neste âmbito, salienta-se o desenvolvimento de *apatamers* contra HIV, HCMV ou HCV.

A Tecnologia antisense, por sua vez, consiste num tipo de terapia genética baseada na produção de cadeias simples de DNA e RNA, utilizadas para minimizar os efeitos resultantes da expressão exacerbada de genes causadores de doenças. Esta tecnologia, revela-se de especial interesse na área da virologia, uma vez que possibilita bloquear a expressão de genes causadores de doenças. A título de exemplo, salienta-se o Vitravene®. Este ultimo, foi o primeiro fármaco baseado nesta tecnologia, a ser aprovado pela FDA.

Para terminar, salientamos DRACO, como a mais recente evolução na erradicação de infecções virais. DRACO, consiste numa proteína, com capacidade de actuar contra um vasto leque de vírus. Assim, é comumente equiparado á penicilina, na medida em que se define como um anti-viral de largo espectro. Esta super-proteína, reconhece rapidamente os vírus e força-os a cometer apoptose, pelo intermédio da libertação de uma enzima (caspase).

Em modo de conclusão, poder-se-á afirmar, que a virologia ao dispor da indústria farmacêutica, é uma área de elevado interesse, em que apesar dos mais recentes progressos a ela associados, tem ainda muito potencial para desenvolvimentos futuros. Com este texto, e considerando o enquadramento inicial em que se definem vírus, as suas características e propriedades, se percebe que a virologia associada aos mais recentes desenvolvimentos biotecnológicos, poderá assumir-se cada vez mais como uma área de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos ou novas estratégias terapêuticas. Destes, salientam-se: o desenvolvimento de novas vacinas, não só pelos seus benefícios económicos, mas também pela sua capacidade de conferir eficazmente protecção; a crescente utilização de vírus como vectores no combate a doenças e direccionamento farmacológico; o desenvolvimento de novos *aptamers* para um leque cada vez maior de infecções e finalmente a tecnologia DRACO pela sua abrangência.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Besseling, J., Hovingh, G.K. & Stroes, E.S.G., 2013. Antisense oligonucleotides in the treatment of lipid disorders: Pitfalls and promises. *The Netherlands journal of medicine*, 71(3), pp.118–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23712806>.
- Binning, J.M., Leung, D.W. & Amarasinghe, G.K., 2012. Aptamers in virology: recent advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 3(February), p.29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3274758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 18, 2013].
- Bouard, D., Alazard-Dany, D. & Cosset, F-L, 2009. Viral vectors: from virology to transgene expression. *British journal of pharmacology*, 157(2), pp.153–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2629647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 14, 2013].
- Dias, N. & Stein, C.A., 2002. Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms Minireview Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms. , pp.347–355.
- Diez, J. et al., 2012. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microbial cell factories*, 11, p.52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3420326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ferreira, C.S.M. et al., 2007. Aptamer-based Therapeutics Radiopharmaceutical Design their Potential in. , 50(September), pp.63–76.
- Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F. de & Lima, N., 2010. *Microbiologia LIDEL*- edi., Lousã: LIDEL.
- Galderisi, U., Cascino, a & Giordano, a, 1999. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *Journal of cellular physiology*, 181(2), pp.251–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497304>.
- Gilmore, B.F., 2012. Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(5), pp.533–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702317>.

- Glick BR and Pasternak JJ, 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* L. Y. Kun, ed., Washington DC: Press, ASM.
- Jager, L. & Ehrhardt, A., 2007. Emerging adenoviral vectors for stable correction of genetic disorders. *Current gene therapy*, 7(4), pp.272–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17969560>.
- Kay, M. A.; Glorioso, J.C.. & Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy : the art of turning infectious. *Nature*, 7(1), pp.33–40.
- Van der Merwe, R. & Molfino, N. a, 2012. Challenge models to assess new therapies in chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 7, pp.597–605. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3459659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nabel, G.J., 2013. Designing tomorrow’s vaccines. *The New England journal of medicine*, 368(6), pp.551–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388006> [Accessed March 1, 2013].
- Rider, T.H. et al., 2011. Broad-spectrum antiviral therapeutics. *PloS one*, 6(7), p.e22572. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3144912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 28, 2013].
- Stein, K.E. & Webber, K.O., 2001. The regulation of biologic products derived from bioengineered plants. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), pp.308–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404111>.
- Sulakvelidze, A. et al., 2001. Bacteriophage Therapy MINIREVIEW. , 45(3).
- Verhoeyen, E. & Cosset, François-Loïc, 2004. Surface-engineering of lentiviral vectors. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1, pp.S83–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978753> [Accessed March 5, 2013].
- www.goldcopd.org/, Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2013. Available at: <http://www.goldcopd.org/> [Accessed June 13, 2013].
- www.theairspace.net, DRACO. Available at: <http://theairspace.net/science/draco-the-mean-unseen-virus-killing-machine/>.