

INÊS ESCUDERO DE SOUSA

Terapêutica farmacológica antiviral específica em infecções por Picornavírus

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2011

INÊS ESCUDERO DE SOUSA

Terapêutica farmacológica antiviral específica em infecções por Picornavírus

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2011

INÊS ESCUDERO DE SOUSA

Terapêutica farmacológica antiviral específica em infecções por Picornavírus

**Monografia apresentada à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador:

Prof. Doutor José Cabeda

Sumário

A família *Picornaviridae* consiste em mais de 200 espécies de vírus associados a inúmeras doenças com um elevado interesse clínico, entre as quais, poliomielite, meningite asséptica, constipação e encefalite. Esta família engloba 12 géneros, quatro dos quais (*Enterovírus*, *Hepatovírus*, *Parechovírus* e *Kobuvírus*) são patogénicos para o homem.

Os picornavírus são vírus de RNA positivo constituídos por uma cápside icosaédrica regular. Estes vírus são responsáveis por infeções endémicas, como é o caso do *Poliovírus* e infeções de carácter epidémico como no caso do *Rhinovírus*. A intensidade da doença é muito variável, uma vez que na maior parte dos casos estamos perante uma doença assintomática ou um quadro clínico ligeiro que apresenta uma resolução espontânea, mas em outros casos pode originar um quadro patológico grave.

Até ao momento não existe nenhuma molécula aprovada para o tratamento específico de infeção por picornavírus. No entanto devido à gravidade de determinadas doenças como é o caso da poliomielite e da hepatite foram desenvolvidas vacinas de modo, a travar a gravidade das infeções e no caso da poliomielite foi possível limitar o seu carácter endémico. Uma vez, que a maior parte das infeções são de resolução espontânea, apenas se realiza o tratamento dos sintomas que o doente apresenta. Contudo devido à enorme influência económica e social das infeções por picornavírus encontram-se em desenvolvimento várias drogas para uso nestas infeções, as quais serão discutidas apesar do seu carácter experimental. Até à data foram desenvolvidos cerca de 100 compostos que demonstraram *in vitro*, actividade contra picornavírus. Estes actuam em diferentes etapas do ciclo viral, nomeadamente o bloqueio da interacção vírus-receptor, desencapsulação, replicação do RNA viral, síntese de proteínas virais ou a susceptibilidade da célula. Apesar do enorme número de possíveis fármacos para uso neste tipo de vírus, muitos deles não atingiram a fase de ensaios clínicos. Este facto ficou a dever-se a problemas relacionados com a sua fraca biodisponibilidade, eficácia, toxicidade e segurança. Os ensaios clínicos em curso para as restantes drogas ainda não permitiram a sua aprovação para uso comercial. A ausência de aprovações relaciona-se em alguns casos com a fase precoce dos ensaios clínicos, e noutros casos com a dificuldade de encontrar drogas cujos efeitos secundários não ultrapassem o risco de uma infeção que habitualmente se resolve espontaneamente.

Summary

The Picornaviridae family consists of over 200 species of viruses associated to countless diseases with a high clinical interest, including, poliomyelitis, aseptic meningitis, common cold and encephalitis. This family includes 12 genera, four of which (Enteroviruses, Hepatoviruses, Parechoviruses and Kobuviruses) are pathogenic to humans.

The Picornaviruses are RNA viruses consisting of a positive regular icosahedral capsid. They are responsible for endemic infections, such as the Polioviruses and infections of epidemic character as is the case of Rhinoviruses. The intensity of the disease is highly variable, since in most cases we are dealing with an asymptomatic or mild clinical condition that presents a spontaneous resolution, but in other cases it can cause a severe pathological condition.

There is, to date, no molecule approved for the specific treatment of picornavirus infection. However due to the severity of certain diseases, as is the case of polio and hepatitis, vaccines were developed to curb the severity of infections and in the case of polio its use has limited its endemic nature. Given that the majority of infections are of spontaneous resolution, only symptomatic treatment is carried out. Despite the fact that, to date, no molecule has been approved for the specific treatment of picornavirus infection, its economic and social burden has driven intensive research in a number of promising experimental molecules that will be discussed. So far about 100 compounds have been developed that showed in vitro activity against picornaviruses. These act at different stages of the viral cycle, namely the blocking of virus-receptor interaction, uncoating, replication of viral RNA, synthesis of viral proteins or the susceptibility of the cell. Despite the huge number of potential drugs for use in this type of virus, many have not reached the stage of clinical trials. This was due to problems related to their poor bioavailability, efficacy, toxicity and safety. The ongoing clinical trials for other drugs has not yet allowed its approval for commercial use. The lack of approval relates in some cases with early stage clinical trials and in other cases with the difficulty of finding drugs whose side effects do not outweigh the risk of an infection that usually resolves spontaneously.

Aos meus pais e irmão,

À minha avó.

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas, que com diferentes contributos, me apoiaram em mais esta etapa, às quais quero expressar o meu agradecimento:

Aos meus pais e irmão por todo o apoio, amor, compreensão e incentivo incondicional, durante esta longa caminhada.

À minha família por todo o apoio e incentivo.

Aos meus amigos, que estiveram sempre do meu lado, apoiando-me, incentivando-me e com os quais sempre vou poder contar.

Aos meus colegas, que ao longo dos cinco anos demonstraram sempre disponibilidade e acima de tudo espírito de equipa.

À Universidade Fernando Pessoa, ao Reitor da Universidade Fernando Pessoa, Prof. Doutor Salvato Trigo por proporcionar aos alunos excelentes condições de ensino, para estes se tornarem profissionais competentes e a todos os meus professores por me ensinaram o que é ser farmacêutico.

Finalmente, agradeço ao Professor Doutor José Cabeda pela orientação na elaboração deste trabalho e pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstrou.

Índice

I-INTRODUÇÃO	1
1.1 ESTRUTURA.....	4
1.2 CICLO DE VIDA	5
1.3 PATOLOGIAS	7
1.3.1 Rhinovírus	7
1.3.2 Poliovírus	7
1.3.3 Outros <i>Enterovírus</i>	8
1.3.3.1 Encefalite.....	8
1.3.3.2 Meningite asséptica	9
1.3.3.3 Miocardite	9
1.3.3.4 Conjuntivite hemorrágica.....	9
1.3.3.5 Herpangina	10
1.3.3.6 Doença da mão-pé-boca	10
1.3.3.7 Doença febril não específica	10
1.3.3.8 Doença de Bornholm.....	11
1.3.4 Hepatovírus	11
1.3.5 Kobuvírus	12
1.3.6 Parechovírus	12
II-EPIDEMIOLOGIA.....	13
III-DIAGNÓSTICO	17
3.1 TÉCNICAS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO	17
3.2 <i>ENTEROVÍRUS</i>	19
3.2.1 <i>Poliovírus</i>	19
3.2.2 <i>Coxsackievírus e Echovírus</i>	19
3.2.3 <i>Rhinovírus</i>	20
3.3 <i>HEPATOVÍRUS</i>	20
IV-TRATAMENTO	21
4.1 TRATAMENTO SINTOMÁTICO	21
4.2 TRATAMENTO ESPECÍFICO.....	21
4.2.1 Vacinas	21
4.2.2 Inibidores da fixação, entrada e desencapsulação.....	23
4.2.2.1 Compostos Win.....	23

4.2.2.2 R618737, Pirodavis e Eter oximas relacionados	26
4.2.2.3 Derivados do isoxazol	27
4.2.2.4 Piridil Imidazolidinonas	28
4.2.2.5 SCH 38057, SCH 47802 e SCH 48973.....	29
4.2.2.6 SDZ 35-682 e SDZ 880-061	30
4.2.2.7 Chalconas	31
4.2.2.8 BW 683C e análogos.....	32
4.2.2.9 Rodanina.....	33
4.2.2.10 44 081 RP	33
4.2.2.11 Dibenzofurano e derivados do Dibenzosuberol	33
4.2.2.12 MDL 20,610 e análogos	34
4.2.2.13 Fenoxibenzeno, Fenoxipiridinas e análogos	34
4.2.2.14 Imunoglobulina Sérica Intravenosa.....	36
4.2.2.15 ICAM-1 Solúvel.....	36
4.2.3 Inibidores da Replicação	37
4.2.3.1 Cloridrato de Guanidina.....	37
4.2.3.2 HBB.....	37
4.2.3.3 MRL-1237.....	38
4.2.3.4 TBZE-029.....	38
4.2.3.5 Enviroxima.....	39
4.2.3.6 2-FMC	40
4.2.3.7 Derivados do isotiazol.....	41
4.2.3.8 Flavonóides	41
4.2.3.9 Gliotoxina.....	43
4.2.3.10 Análogos nucleosídeos.....	43
4.2.3.11 Pirrolidina Ditiocarbamato.....	43
4.2.4 Inibidores de Protease	44
4.2.4.1 ProteaseL do FMDV	44
4.2.4.2 Inibidores da protease 2A.....	45
4.2.4.2.1 Agentes tiol-alquilantes.....	45
4.2.4.2.2 Inibidores clássicos específicos da elastase	45
4.2.4.2.3 Homoftalimidas.....	46
4.2.4.2.4 Compostos baseados em fluórmetil cetonas.....	46
4.2.4.3 Inibidores da 3C protease.....	46

4.2.4.3.1 Extractos Microbianos.....	46
4.2.4.3.2 Inibidores péptídicos	47
4.2.4.3.3 Inibidores não peptídicos.....	53
4.2.5 Montagem e Saída do vírus.....	56
V CONCLUSÃO.....	58
VI BIBLIOGRAFIA.....	62

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura icosaédrica de partícula viral de Picornavírus.....	4
Figura 2: Genoma do Picornavírus.....	5
Figura 3: Ciclo de Vida dos Picornavírus	6
Figura 4: Etapas do desenvolvimento do Pleconaril	25
Figura 5: R618737, Pirodavir e Eter oximas relacionados	27
Figura 6: Derivados isoxazol	28
Figura 7: Derivados do Piridil imidazolidinonas	29
Figura 8: Compostos desenvolvidos pela Schering- Plough.....	30
Figura 9: Compostos desenvolvidos pela Sandoz Forschungsinstitut	31
Figura 10: Chalconas.....	31
Figura 11: BW 683C e análogos.	32
Figura 12: Rodanina	33
Figura 13: 44 081 R.P.	33
Figura 14: Dibenzofurano e Dibenzosuberol	34
Figura 15: MDL 20,610 e análogos	34
Figura 16: Fenoxibenzeno, Fenoxipiridinas e análogos.....	36
Figura 17: Cloridrato de Guanidina	37
Figura 18: Composto HBB.....	38
Figura 19: MRL-1237	38
Figura 20: TBZE-029.....	39
Figura 21: Enviroxima e análogos	40
Figura 22: 2-FMC	40
Figura 23: Derivados do Isotiozol.....	41
Figura 24: Flavonóides	42
Figura 25: Gliotoxina	43
Figura 26: Pirrolidina Ditiocarbamato	44
Figura 27: ProteaseL do FMDV	44
Figura 28: Agentes tiol-alquilantes	45
Figura 29: Elastatinal	45
Figura 30: Extractos Microbianos	47
Figura 31: AG6084	48

Figura 32: AG7088	49
Figura 33: Azapéptidos	49
Figura 34: Inibidor tripeptidil-DMK Z-L-F-Q-CHN ₂	50
Figura 35: Composto 13a.....	50
Figura 36: Composto 24.....	51
Figura 37: Derivado do S-nitrosotiol.	51
Figura 38: Derivado da iodoacetamida	52
Figura 39: Composto 41	52
Figura 40: Inibidores derivados da Benzamida.....	53
Figura 41: Composto 8.....	53
Figura 42: Composto 7.....	54
Figura 43: Homoftalimidas	54
Figura 44: D-N-Cbz-Serina β-Lactonas	55
Figura 45: Composto 1	55
Figura 46: Inibidores não-péptidicos de baixo peso molecular.....	56
Figura 47: Hidantoína	57

Índice de Tabelas

Tabela 1: Taxonomia dos Picornavírus.....	3
Tabela 2: Número de casos de pessoas infectadas por <i>Poliovírus</i> em diferentes países.....	13

Abreviaturas

cDNA.....	DNA complementar
CVA.....	<i>Coxsackievirus A</i>
CVB.....	<i>Coxsackievirus B</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
EC ₅₀	Concentração Efectiva 50%
EV.....	<i>Enterovirus</i>
HAV	<i>Hepatovirus Humano</i>
HRV	<i>Rhinovirus Humano</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
ICTV.....	Comité Internacional da Taxonomia dos Virus
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
mRNA.....	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR.....	Reacção em Cadeia da Polimerase
RNA.....	Ácido Ribonucleico
RT PCR	Transcriptase Reversa PCR
US FDA	United States Food and Drug Administration

I-Introdução

A família *Picornaviridae* é constituída por vírus de RNA de pequenas dimensões. Em Agosto de 2009 o Comité Internacional da Taxonomia dos Vírus (ICTV) efectuou uma actualização na taxonomia viral dos Picornavírus, a qual introduziu algumas modificações, tais como a introdução dos novos géneros *Sapelovírus*, *Senecavírus*, *Tremovírus* e *Avihepatovírus* e a reclassificação dos *Rhinovírus* no género dos *Enterovírus* (Tabela 1). Assim, na mais recente taxonomia viral, a família Picornaviridae encontra-se distribuída por doze géneros (*Enterovírus*, *Cardiovírus*, *Aphthovírus*, *Hepatovírus*, *Parechovírus*, *Erbovírus*, *Kobuvírus*, *Echovírus*, *Senecavírus*, *Tremovírus* e *Avihepatovírus*), dos quais apenas quatro são patogénicos para o homem (*Enterovírus*, *Parechovírus*, *Kobuvírus* e *Hepatovírus*) (Tabela 1) (Rotbart, 2002; Picornaviridae Study Group, 2009).

O primeiro Picornavírus a ser estudado foi o *Poliovírus*, consistindo num importante marco da Virologia. Os primeiros casos foram reportados em 1789 pelo médico Michael Underwood, o qual verificou que o principal alvo desta infecção eram crianças, e por essa razão a doença ficou conhecida como Paralisia Infantil (Semler et al, 2002; De Palma et al, 2008).

Mais tarde, no início do século XX foi declarado um estado de epidemia, devido ao elevado número de casos registados. Em 1908 Karl Landerstainer tentou com sucesso provocar a mesma doença em macacos, inoculando fezes provenientes de crianças infectadas no sistema nervoso dos animais. No entanto só em 1949 é que foi possível a sua detecção utilizando meios mais económicos. Este facto deveu-se em grande parte à detecção feita através de uma cultura de células não nervosas onde se verificou, não só que este vírus se conseguia multiplicar noutra tipo de células como foi possível visualizar o seu efeito citopático. Com esta descoberta Enders, Weller e Robbins, em 1954 foram premiados com um Prémio Nobel, proporcionando um novo rumo na investigação *in vitro* destes vírus em humanos e animais, o que levou então à procura de novos vírus pertencentes a esta enorme família (Ferreira et al, 2002; Jesus, 2007).

Em 1955 apareceu a primeira vacina contra o *Poliovírus*, esta, utilizava o vírus inativado, o que impedia a sua replicação após a sua administração e permitia a sua utilização em grávidas e em indivíduos imunocomprometidos. As principais desvantagens estão relacionadas com o custo e a sua via de administração, uma vez que a toma é realizada por via injectável. Passados 8 anos apareceu uma nova vacina, que utilizava o vírus na sua forma atenuada. A sua vantagem em relação à primeira era a facilidade de administração, no entanto à custa de um maior risco clínico. Com o aparecimento das vacinas e com a ajuda da Organização Mundial de Saúde, que em 1988 lançou uma campanha sobre a erradicação do *Poliovírus* o número de casos de infecção diminuiu drasticamente (Jesus, 2007; Hunt, 2010).

Terapêutica farmacológica antiviral específica em infecções por Picornavírus

Tabela 1: Taxonomia dos Picornavírus. (Adaptado de: Rossmann et al, 2002; Semler et al, 2002).

GENERO	ESPECIE/SEROTIPO	HOSPEDEIRO	DOENÇAS PRINCIPAIS NO HOMEM	RECEPTOR
<i>Enterovírus</i>	Enterovírus Humano A			
	Coxsackievírus A 2,3,5,7,8,10,12,14,16	Homem	Herpangina, Doença da mão-pé-e-boca, Doença respiratória, Meningite	N.D.
	Enterovírus 71	Homem	Doença da mão-pé-e-boca, Encefalite	N.D.
	Enterovírus Humano B			
	Coxsackievírus A9	Homem	Meningite, Herpangina	$\alpha\beta 3$
	Coxsackievírus B1, B3, B5	Homem	Miocardite, Pleurodia, Meningite	DAF
	Coxsackievírus B1 a B6	Homem	Doença Respiratória, Meningite	HCAR
	Echovírus 1,8	Homem	Meningite, Encefalite, Pleurodia, Exantema	VLA-2 $\alpha 2\beta 1$
	Echovírus 2 a 7, 11 a 21, 24, 27, 29 a 33	Homem	Meningite	DAF(CD55)
	Enterovírus 69	Homem	Meningite	N.D.
	Enterovírus Humano C			
	Poliovírus tipos 1,2,3	Homem	Poliomielite	CD155 (PVR)
	Coxsackievírus A1,11,13,15,17,18 a 22, 24	Homem	Constipação comum, Diarreia Infantil, Herpangina	ICAM-1(CD54)
	Enterovírus Humano D			
	Enterovírus 70	Homem	Conjuntivite Hemorrágica Aguda	DAF (CD55)
	Enterovírus de Símio A	Animal		
	Enterovírus Bovino	Animal		
	Enterovírus Porcino B	Animal		
	Rhinovírus Humano A e B			
	Rhinovírus do grupo Major (> 90 serótipos)	Homem	Constipação comum, agravamento da Asma, Fibrose Cística e DPOC	ICAM-1 (CD54)
Rhinovírus do grupo minor (> 10 serótipos)	Homem	Constipação comum, agravamento da Asma, Fibrose Cística e DPOC	LDL receptor (LDLR)	
Rhinovírus Humano C	Homem	Constipação comum, agravamento da Asma, Fibrose Cística e DPOC		
<i>Cardiovírus</i>	Vírus da Encefalomiocardite	Animal		
	Theilovírus	Animal		
<i>Aphthovírus</i>	Vírus da Febre aftosa	Animal		
	Vírus da Rinite equina A	Animal		
	Vírus de rinite bovina B	Animal		
<i>Hepatovírus</i>	Vírus da Hepatite A	Homem	Hepatite A	HAVcr-1
<i>Parechovírus</i>	Parecovírus Humano	Homem	Doença Respiratória, Encefalite	N.D.
	Ljungan vírus	Animal		
<i>Erbovírus</i>	Vírus da rinite equina B	Animal		
<i>Kobuvírus</i>	Aichi Vírus (Kobuvirus Humano)	Homem	Gastroenterite	N.D.
	Kobuvírus Bovino	Animal		
<i>Teschovírus</i>	Teschovírus Porcino	Animal		
<i>Sapelovírus</i>	Sapelovírus porcino	Animal		
	Sapelovírus simio	Animal		
	Sapelovírus aviático	Animal		
<i>Senecavírus</i>	Vírus vale do Seneca	Animal		
<i>Tremovírus</i>	Vírus da encefalomielite aviária	Animal		
<i>Avihepatovírus</i>	Vírus da Hepatite A aviática	Animal		

1.1 Estrutura

Os Picornavírus apresentam um genoma de RNA de polaridade positiva e não possuem invólucro, o que lhes confere resistência ao álcool, éter e clorofórmio. Por outro lado apresentam sensibilidade relativamente a tratamentos feitos com formaldeído e radiações ionizantes. Contêm uma cápside icosaédrica (Figura 1.C) constituída por 60 subunidades e 12 vértices pentaméricos (Figura 1.B), sendo que cada uma é constituída por 5 unidades de proteínas protoméricas (Figura 1.A). Os receptores vão ligar-se numa zona designada como Canyon, a qual se encontra à volta de cada um dos vértices (De Palma et al., 2008; Rotbart, 2002).

Por clivagem de uma poliproteína produzida durante o processo de replicação obtêm-se as quatro proteínas da cápside (VP1, VP2, VP3 e VP4). As proteínas VP1, VP2 e VP3 são responsáveis pela estrutura icosaédrica característica, as quais se vão dispor à superfície da partícula, enquanto a proteína VP4 não se encontra à superfície e juntamente com a terminação amino das proteínas VP1 e VP2 funciona como um elo de ligação entre a cápside e o genoma. Por essa razão esta proteína só é clivada com a incorporação do genoma na cápside (De Palma et al., 2008; Rotbart, 2002; Ferreira et al., 2002).

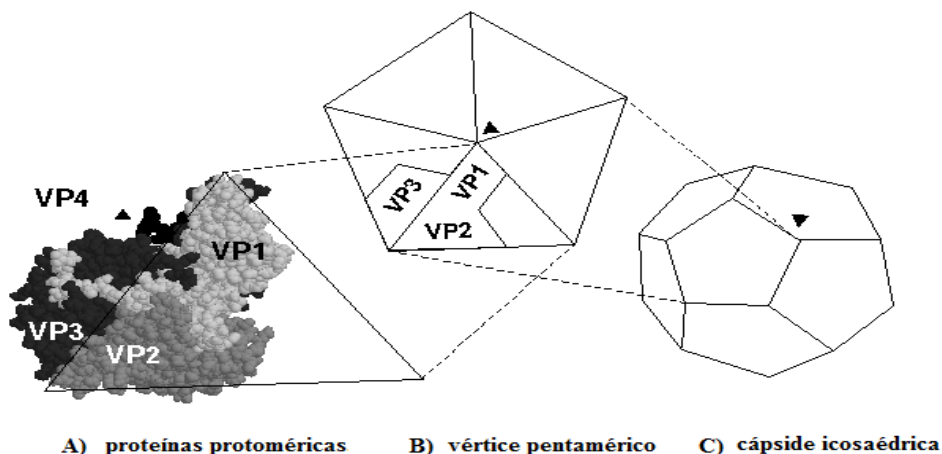


Figura 1: Estrutura icosaédrica de partícula viral de Picornavírus (Adaptado de: Rueckert, 1996).

Como já referido o RNA dos picornavírus é de polaridade positiva, o que significa que ele funciona também como RNA mensageiro. Assim, esta molécula é capaz de mediar a transcrição e replicação, sendo por isso infecciosa mesmo sem a cápside. O RNA é de cadeia simples, linear e constituído por cerca de 7400 pares de bases. O genoma contém na extremidade 5' uma proteína VPg que é codificada pelo próprio vírus, enquanto na parte oposta ou seja na extremidade 3' é poliadenilado (Figura 2). A proteína VPg por clivagem dá origem a proteínas necessárias à síntese de RNA. O genoma do vírus para além de codificar as suas proteínas da cápside e a proteína VPg, codifica ainda uma protease e uma RNA-polimerase, RNA dependente (De Palma et al, 2008; Rotbart, 2002; Ferreira et al, 2002).

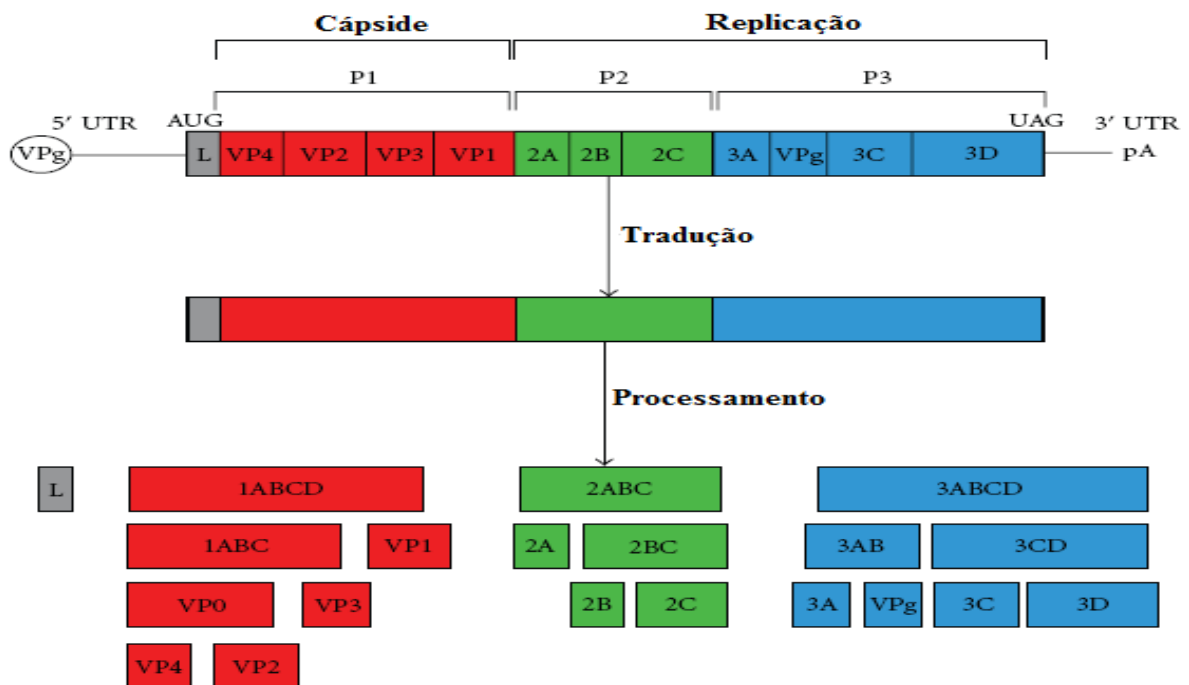


Figura 2: Genoma do Picornavírus (Adaptado de: Kerkvliet et al, 2010).

1.2 Ciclo de Vida

Para que ocorra o processo de infecção, os Picornavírus necessitam de interagir com receptores específicos (Figura 3.1 e Tabela 1) que se encontram na membrana citoplasmática das células do hospedeiro. Após a ligação do vírus ao seu receptor, este entra na célula e ocorre a primeira modificação: a perda da proteína VP4, o que se traduz na saída do RNA viral (Figura 3.2). Uma vez que o RNA viral dos picornavírus

funciona como mRNA, a tradução (Figura 3.3) é feita directamente pelos ribossomas da célula, levando à formação de uma poliproteína (Figura 3.4), que após a clivagem com uma protease viral dá origem a todas as outras proteínas estruturais da cápside e também às proteínas necessárias durante o processo de replicação. Depois da formação destas proteínas e da polimerase é que começam a surgir cadeias de RNA de polaridade negativa (Figura 3.5) que vão servir de modelo para a formação de novas cadeias de RNA viral com polaridade positiva (Figura 3.6). Estas vão sendo encapsuladas, dando origem ao virião, que ainda vai sofrer um período de maturação (Figura 3.7). Durante este processo vão ocorrer diversas clivagens, a primeira ocorre na proteína P1 (proteína precursora da cápside) a qual vai dar origem às proteínas VP0, VP1 e VP3 (Figura 2). Quando ocorre a clivagem de VP0 forma-se VP2 e VP4, tornando o vírus infeccioso. Esta última clivagem só ocorre depois de o RNA estar envolvido pela cápside. A saída dos vírus da célula ocorre por lise celular (Figura 3.8) (De Palma et al, 2008; Ferreira et al, 2002).

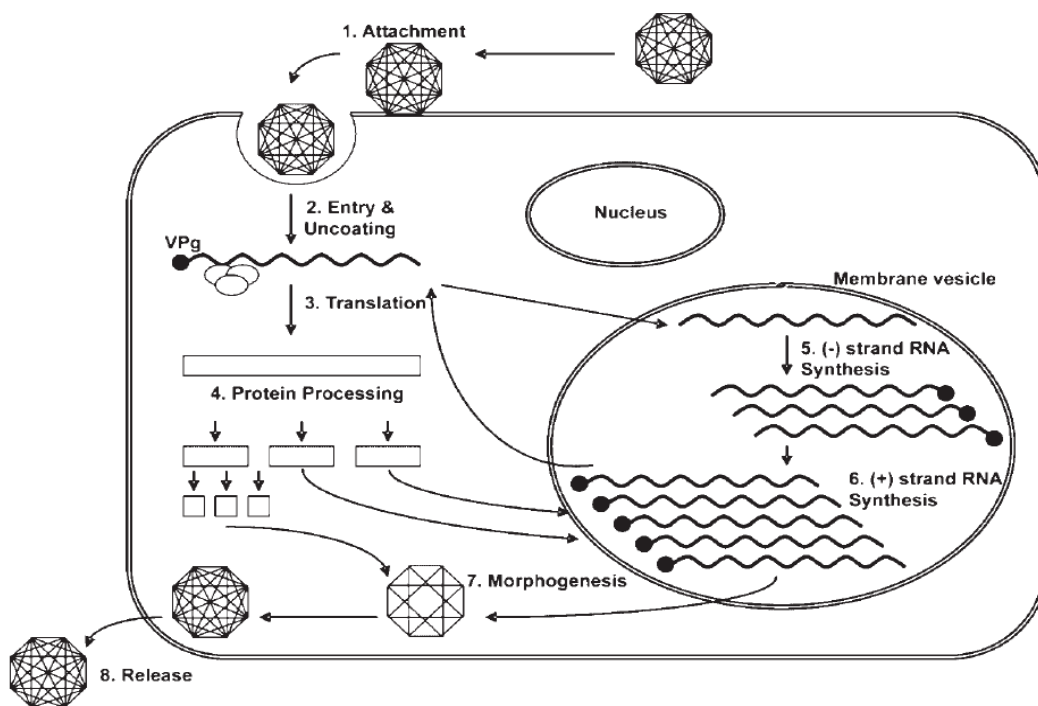


Figura 3: Ciclo de Vida dos Picornavírus (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

1.3 Patologias

A infecção por Picornavírus abrange um leque de patologias que vão desde doenças pouco graves como por exemplo uma constipação até doenças muito graves como é o caso da hepatite A e da Poliomielite. De todos os membros apenas os *Enterovírus*, *Hepatovírus*, *Kobuvírus* e *Parechovírus* são responsáveis por infecções virais em humanos (Rotbart, 2002).

1.3.1 Rhinovírus

O *Rhinovírus*, está associado a infecções respiratórias tanto do tracto respiratório superior como do inferior, sendo o principal responsável pela constipação. Estas infecções são mais frequentes na altura da Primavera e Outono e a transmissão é feita por via oral, através do contacto directo com secreções ou aerossóis (Ferreira et al, 2002; Mackay, 2008).

O período de incubação é variável com o aparecimento de sintomatologia a ocorrer mais ou menos a partir do quinto dia após a infecção. Os principais sintomas são: cefaleias, mal-estar, obstrução nasal, arrepios, dores de garganta, espirros e febre, no entanto esta última pode ou não existir e é mais comum em crianças (Ferreira et al, 2002; Mackay, 2008).

Por vezes a infecção viral pode funcionar como um factor de predisposição para outras doenças de origem bacteriana como por exemplo: Otite média aguda, sinusite e agravamento da Asma e da Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica e dos sintomas respiratórios da Fibrose Cística (Peltola et al, 2008; Rotbart, 2002).

1.3.2 Poliovírus

O *Poliovírus*, é responsável pela Poliomielite. Durante o período epidémico esta infecção era facilmente disseminada entre diversas comunidades. A sua transmissão faz-se por via fecal-oral, apresentando um período de incubação com uma duração em média de 14 dias, no entanto este pode variar entre 3 a 35 dias (Atkinson et al, 2009; Ferreira et al, 2002; Semler et al, 2002).

A doença pode ser sintomática e assintomática, sendo esta última a que ocorre em pelo menos 90% dos casos. Dentro da doença sintomática podemos distinguir três tipos de infecção segundo a sua gravidade: a poliomielite abortiva, poliomielite não paralítica e poliomielite paralítica. A Poliomielite abortiva ocorre durante a primeira semana de infecção e apresenta uma sintomatologia ligeira, como febre, cefaleias e mal-estar. Por vezes pode mesmo ocorrer o vômito, dores musculares e dores de garganta. A resolução é espontânea em apenas alguns dias. Caso ocorra agravamento dos sintomas é necessário recorrer a análises laboratoriais uma vez que existem outros *Enterovírus* que apresentam uma sintomatologia semelhante. A Poliomielite não paralítica apresenta a mesma sintomatologia descrita anteriormente no entanto numa forma mais acentuada, e a sua resolução também é espontânea. Neste caso o Sistema Nervoso encontra-se envolvido causando rigidez na nuca o que clinicamente está associada a uma meningite asséptica. Por último, a Poliomielite paralítica apresenta toda a sintomatologia descrita nas formas anteriores, no entanto o envolvimento do Sistema Nervoso Central é variável, quer isto dizer que a paralisia pode aparecer subitamente sem apresentar uma sintomatologia severa ou então apresentar-se como uma paralisia severa muito grave, que pode levar a incoordenação motora, paralisia respiratória e impossibilidade de deglutição. A taxa de mortalidade é cerca de 2-3%. Para além da poliomielite e da meningite asséptica o *Poliovírus* pode ainda estar associado ao síndrome febril (Atkinson et al, 2009; Ferreira et al, 2002; Semler et al, 2002).

1.3.3 Outros *Enterovírus*

1.3.3.1 Encefalite

A Encefalite é uma doença pouco comum e pode levar a sequelas a longo prazo. Apresenta um quadro de evolução favorável, necessitando apenas de tratamento sintomatológico. Numa percentagem extremamente pequena o paciente pode entrar em coma. Os casos mais graves estão relacionados com o *Enterovírus 71*, que por vezes pode provocar a morte do doente. A doença encontra-se associada a um quadro de depressão neurológica. Os primeiros sintomas são febre, mialgias e sintomas respiratórios. Relativamente aos sintomas a nível do Sistema Nervoso Central verifica-se uma certa irritabilidade, fraqueza, confusão e letargia (Ferreira et al, 2002; Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

1.3.3.2 Meningite asséptica

A meningite asséptica é provocada por *Echovírus* ou *Coxsackievírus A e B*, cuja severidade depende de dois factores: idade do hospedeiro e o seu sistema imune. Os casos mais graves estão relacionados com a infecção em neonatais com pelo menos duas semanas de vida, originando uma doença sistémica severa que normalmente está associada a uma meningite ou meningoencefalite. Esta doença tem um início repentino e é acompanhada com febres na ordem dos 38°C, dores de cabeça, fotofobia, vômitos, diarreia, tosse, faringite e mialgia. Em crianças com cerca de 1 a 2 anos de idade é costume aparecer rigidez na nuca. A doença apresenta uma evolução favorável e de resolução espontânea em cerca de uma semana (em alguns casos pode prolongar-se até às 2 semanas) e não provoca sequelas de longo prazo (Hunt, 2010; Tavakoli et al, 2008; Rotbart, 2002; Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

1.3.3.3 Miocardite

A miocardite é causada pelo *Coxsackievírus B3*, trata-se de uma inflamação no miocárdio, cuja taxa de mortalidade é elevada. Os grupos de maior risco são os recém nascidos e as crianças com menos de 6 meses de idade. A sintomatologia inclui palpitações e dor no peito que podem ser acompanhados por vezes de febre. No caso particular de recém-nascidos a sintomatologia característica é uma súbita insuficiência cardíaca e febre, enquanto que em crianças com menos de 6 meses a insuficiência cardíaca é mais tardia. O tratamento existente é apenas sintomatológico. (Esfandiarei et al, 2008; Hunt, 2010; Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

1.3.3.4 Conjuntivite hemorrágica

A conjuntivite hemorrágica é provocada maioritariamente pelo *Enterovírus 70*, e caracteriza-se por uma hemorragia subconjuntival abrupta. Normalmente é mais comum nos adultos, apresenta uma evolução favorável e de resolução numa semana. Esta infecção apresenta um período de incubação ente 24 a 48 horas. Os principais sintomas derivam do inchaço das pálpebras associado a congestão ocular, que leva a lacrimação e dor (Ferreira et al, 2002; Semler et al, 2002).

1.3.3.5 Herpangina

A Herpangina é causada pelo *Coxsackievírus A*, é mais comum em crianças entre 1 e 7 anos de idade, no entanto não se pode excluir os adultos e os neonatos. Esta doença é manifestada através de uma inflamação da garganta, disfagia e cefaleias, no entanto também podem ocorrer vômitos e dores na zona abdominal. Esta infecção dura cerca de uma semana e os sintomas entram num período de regressão passados 4 dias. Necessita apenas de tratamento sintomático (Hunt, 2010; Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

1.3.3.6 Doença da mão-pé-boca

A doença da mão-pé-boca é vulgarmente causada pela espécie *Coxsackievírus A16*. Caracteriza-se por uma erupção cutânea tal como o nome indica nas mãos, pés e boca. É uma doença característica em crianças com menos de 10 anos, contudo pode ocorrer também em jovens e adultos. A sua transmissão faz-se através do contacto com fezes, bolhas ou ainda secreções provenientes da garganta e nariz. A primeira manifestação da doença faz-se através de febre, perda do apetite e dor de garganta. Mais tarde ocorre o aparecimento das bolhas na língua, gengivas e no interior das bochechas. O período de incubação é de 3 a 5 dias e a possibilidade de contágio só ocorre desde o aparecimento dos primeiros sintomas até ao desaparecimento das bolhas. (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; New York State Department of Health., 2004; Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

1.3.3.7 Doença febril não específica

Na doença febril não específica a febre está associada a outros sintomas podendo ou não existir prurido. Esta doença tem importância clínica uma vez que pode imitar outras doenças, como por exemplo septicemia de origem bacteriana ou então herpes. Mais uma vez as crianças são as mais afectadas. Quanto à sintomatologia apresentam-se quadros febris na ordem dos 39°C, irritabilidade, diarreia, vômitos, prurido, sintomas respiratórios, anorexia e letargia. Esta doença tem uma duração cerca de 4 a 5 dias e é

de resolução espontânea. É causada por diversos *Enterovirus* e é mais comum nas alturas do Verão e Outono (Hunt, 2010; Semler et al, 2002).

1.3.3.8 Doença de Bornholm

A doença de Bornholm, também conhecida como Pleurodínia epidémica é uma infecção causada pelo *Coxsackievirus B*. Esta é caracterizada por um súbito aparecimento de febre e dor na região inferior do tórax, podendo ocorrer o aparecimento de vômitos e dor abdominal. O diagnóstico é difícil uma vez que a dor causada na zona do tórax por vezes aparece e desaparece subitamente. A sintomatologia dura cerca de um a dez dias, para além das manifestações acima referidas pode ainda aparecer anorexia, náuseas, tosse e dores de cabeça (Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

1.3.4 Hepatovírus

Este vírus é o responsável pela Hepatite A, a transmissão é feita por via fecal-oral através do contacto com água, alimentos e objectos contaminados. Afecta tanto crianças como adultos e o seu pico é no Outono. Clinicamente esta doença é do tipo moderada, apresenta-se de duas formas: a aguda e a fulminante. Na forma aguda a sintomatologia característica do período prodrómico é anorexia, mal-estar, vômitos problemas gastrointestinais e por vezes pode ainda surgir sintomatologia respiratória. Este período dura normalmente 4 a 10 dias. Relativamente à sintomatologia característica da doença começa pelo aparecimento de alterações na coloração da urina tornando-se mais escura, de seguida aparece a icterícia e fezes descoloradas. Estes sintomas começam a desaparecer e são substituídos pelo prurido. Pode ainda evoluir com artralguas e alterações electrocardiograficas. O período de recuperação varia de 6 a 12 meses. A forma fulminante está relacionada com a necrose total ou parcial do fígado. Em 99% dos casos a recuperação é total e sem sequelas, no entanto 0,1% atingem a fase fulminante e pode ocorrer a morte (Hunt, 2010; Murray et al., 2007; Wilson, 2001).

1.3.5 Kobuvírus

O *Kobuvírus*, mais propriamente o *Aichi vírus* é responsável pela Gastroenterite. Esta transmite-se por via fecal-oral através do contacto directo com alimentos, água ou utensílios contaminados. Os principais sintomas são: diarreia, cólicas, dores abdominais, náuseas, vômitos e por vezes pode ainda ocorrer dores musculares, dores de cabeça e febre. Os sintomas podem aparecer entre 1 a 2 dias e normalmente duram 1 a 10 dias (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Wrong Diagnosis, 2011).

1.3.6 Parechovírus

O Parechovírus humano pode provocar doença respiratória moderada ou encefalite em recém-nascidos. Este último apresenta um quadro clínico associado a febre e convulsões (Drexler, 2009).

II-Epidemiologia

Entre os séculos XIX e XX, ocorreram diversos surtos de poliomielite por todo o mundo, incluindo países que eram considerados desenvolvidos. Em 1789 Michael Underwood tentou descrever a doença e em 1840, o ortopedista Jacob von Heinem descreveu vários casos de crianças que tinham dificuldade em movimentar-se e suspeitava que esse problema tinha a ver com a medula espinhal. Mais tarde, um pediatra sueco, Oskar Medin, reportou mais casos em associação a surtos que aconteciam na Suécia e noutros países da Europa. Em 1908, Karl Landsteiner, conseguiu transmitir a doença a macacos inoculando no seu Sistema Nervoso fezes de crianças que haviam sofrido de poliomielite. Cada vez mais apareciam casos de crianças infectadas por todo mundo, mas em 1930 Franklin Roosevelt sensibilizou a América quando se descobriu que este também tinha contraído a doença. E assim, em 1938, nos Estados Unidos desencadeou-se uma marcha, que ficou conhecida como Marcha do Dime, que recolheu fundos para investigação da doença e a procura de uma vacina eficaz. Devido ao avanço da tecnologia, foi possível em 1946 a primeira visualização do vírus em microscopia electrónica. Em 1949 John Enders, Thomas Weller e Frederick Robbins descobriram o efeito citopático. David Bodian, descobriu a existência de três serótipos diferentes do poliovírus em 1952. Um ano mais tarde, foi realizada a primeira imunização em seres humanos, utilizando o vírus inactivado com formaldeído, levado a cabo por Jonas Salk. Assim, em 1955, foi licenciada Nos Estados Unidos a primeira vacina contra o poliovírus e pouco depois nos restantes países. Entretanto em 1962, Alberto Sabin descobriu uma nova vacina, no entanto esta apresentava o vírus na sua forma atenuada e a sua administração era por via oral. Ambas proporcionaram um decréscimo do número de casos de poliomielite em todo o mundo (Dutta, 2008; Ferreira et al, 2002).

A Organização Mundial de Saúde, desencadeou uma campanha mundial, no sentido de conseguir a erradicação completa da doença em todo o mundo até ao ano de 2000. Antes desta iniciativa a poliomielite era responsável pela paralisia de cerca de 1000 crianças por dia. Actualmente, como se pode ver na Tabela 2 existem apenas quatro países endémicos: Afeganistão, Índia, Nigéria e Paquistão. No Afeganistão o último caso notificado foi no dia 4 de Setembro de 2010, tendo sido reportados neste

país 22 casos em 2009 e 18 em 2010. Para contrariar esta situação foi efectuada uma primeira vacinação que decorreu entre 3 a 5 de Outubro de 2010 e na qual se utilizou a vacina oral bivalente. A segunda vacinação decorreu durante o mês de Novembro, desta vez recorrendo à vacina oral trivalente. No caso da Índia, foram reportados 2 casos, um em Jharkland e outro em Maharashtra, tendo este último sido notificado no dia 16 de Setembro de 2010. Ao todo em 2010 foram reportados 39 casos e em 2009, 395 casos. Na Nigéria, foi reportado apenas um caso recentemente, aumentando para 8 o número de casos em 2010, enquanto no ano de 2009 foram registados 382 casos. Por último, o Paquistão foi aquele que apresentou um aumento do número de casos notificados em comparação com os outros países endémicos e com o ano de 2009. Dia 21 de Setembro reportou-se um novo caso, aumentando para 69 o número de casos em 2010. A primeira fase de vacinação decorreu entre 27 a 29 de Setembro e a segunda entre 11 e 13 de Outubro (Global Polio Eradication Initiative, 2010).

Tabela 2: Número de casos de pessoas infectadas por *Poliovírus* em diferentes países; (Adaptado de: The Global Polio Eradication Initiative, 2010).

Country classification	total districts in country**	2009 total infected districts	2010 total infected districts	01 Jan - 07 Sep *						date of most recent case
				2009			2010			
				districts infected with W1	districts infected with W3	districts infected with W1W2	districts infected with W1	districts infected with W3	districts infected with W1W2	
Endemic										
Afghanistan	329	16	11	11	3		5	6		13-Aug-10
Pakistan	135	34	18	20	8	1	11	11		12-Aug-10
India	627	56	16	21	32	1	6	12		11-Aug-10
Nigeria	774	198	6	52	154	2	3	3		18-Jun-10
Total	1965	304	51	104	197	4	25	32	0	
Re-established transmission										
Angola	164	10	12	7			12			28-Jul-10
DR Congo	508	2	3		2		3			11-Jul-10
Chad	61	29	9		6			9		10-May-10
Sudan	143	24		24						27-Jun-09
Total	876	65	24	31	8	0	15	9	0	
Outbreak countries										
Russian Federation§	83		7				7			4-Aug-10
Tajikistan	65		35				35			4-Jul-10
Nepal	75		2				2			9-Jun-10
Mali	59	2	3	2			3			1-May-10
Senegal	65		11				11			30-Apr-10
Mauritania	53	12	4				4			28-Apr-10
Niger	42	10	1	1	9			1		1-Apr-10
Liberia	15	6	1	6			1			3-Mar-10
Sierra Leone	13	5	1	1			1			28-Feb-10
Guinea	38	19		12						3-Nov-09
Burkina Faso	63	11		9						25-Oct-09
Cameroon	173	2			1					15-Oct-09
Burundi	43	1								12-Sep-09
CAR	24	1			1					9-Aug-09
Côte d'Ivoire	83	19		20						6-Aug-09
Kenya	149	3		3						30-Jul-09
Uganda	80	2		2						10-May-09
Benin	77	14		14						19-Apr-09
Togo	35	5		5						28-Mar-09
Total	1235	112	65	75	11	0	64	1	0	
Global total	3976	481	140	210	216	4	104	42	0	

As infecções causadas pelos Picornavírus são muito comuns e dependem de diversos factores tais como, idade, sexo, condições sanitárias, condições socioeconómicas e a estação do ano. A estação do ano não apresenta um efeito igual para todos os Picornavírus. Com efeito durante a altura do Inverno/Primavera há um maior número de casos de constipações por *Rhinovírus* comparativamente ao Outono/Verão, mas quando nos referimos aos restantes *Enterovírus* passa-se exactamente o contrário nos países temperados. No entanto, nos países tropicais, não podemos dizer o mesmo uma vez que, existe ao longo de todo o ano um elevado número de infecções por *Enterovírus*. No que diz respeito à idade e ao sexo, podemos tomar como exemplo a poliomielite, na qual as mulheres têm uma maior possibilidade de ficar infectadas, por estarem em contacto com as fezes das fraldas dos bebés doentes. Como em qualquer tipo de infecções as medidas higiénicas tanto individuais como colectivas são as mais importantes para o controlo de propagação da infecção. (Ferreira et al, 2002; Hunt, 2010).

As pessoas são infectadas por *Rhinovírus* 2 a 4 vezes por ano o que em termos económicos se traduz num elevado prejuízo, uma vez que infecção com frequência está associada a absentismo laboral e escolar. O consumo de antibióticos também aumenta o que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência das bactérias que mais tarde pode ter consequências negativas para as pessoas que poderão desenvolver uma infecção bacteriana (Ferreira et al, 2002; Wilson et al, 2001).

No caso da Hepatite A a transmissão está relacionada com o tipo de saneamento e a higiene das populações. Esta infecção afecta crianças e torna-se endémica quando as condições de higiene são inexistentes ou insuficientes. As crianças que habitam em locais em que as condições sanitárias são más conseguem obter imunidade nos primeiros anos de vida, no entanto as crianças com menos de um ano de idade é muito raro contraírem a doença e ficarem imunes. Tal facto deve-se aos anticorpos maternos adquiridos durante o período de gestação. A mortalidade é baixa (cerca de 1%,) no entanto a doença torna-se mais perigosa com a idade (Ferreira et al, 2002; Wilson et al, 2001).

Quanto à prevenção deste tipo de infecções, no caso do *Poliovírus*, para além das medidas higiénicas, a vacinação é a melhor forma de adquirir imunidade e evitar a infecção. No caso do *Coxsackievírus e Echovírus*, não existe nenhuma vacina. Assim o controlo passa pela melhoria das condições de higiene e vida das pessoas. Relativamente ao *Rhinovírus*, a prevenção da infecção consiste em eliminar as fontes de contágio. Por último, para prevenir uma infecção por *Hepatovírus* deve proceder-se à melhoria das condições sanitárias e da vacinação. Com estas medidas é possível prevenir o aparecimento da doença e a sua transmissão para outros indivíduos (Ferreira et al, 2002).

III-Diagnóstico

3.1 Técnicas Laboratoriais de Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é um passo muito importante para a caracterização de uma doença, uma vez que em muitos casos os sinais e os sintomas clínicos são semelhantes. Os procedimentos para a pesquisa de qualquer um dos *Enterovírus* são o isolamento do vírus, provas serológicas e PCR (Reacção em cadeia da Polimerase). No caso do *Hepatovírus* são realizadas provas serológicas e análises ao sangue para verificar os valores de parâmetros hepáticos, como as transaminases e a bilirrubina. Para que os vírus se possam replicar necessitam de células vivas, uma vez que são parasitas intracelulares. Para se proceder ao isolamento de vírus no laboratório são utilizados diversos métodos, entre eles culturas de células *in vitro*. No entanto independentemente do método utilizado é necessário ter em conta algumas especificidades de cada vírus, pois podemos obter falsos negativos (Tavakoli et al 2008; Wilson et al, 2001).

Existem diversas culturas celulares e no caso dos *Enterovírus* são utilizadas as linhagens celulares do rim do macaco, Hela, Hep e Vero. Após a inoculação na cultura celular, a replicação viral começa rapidamente, e através da microscopia óptica é possível visualizar, em alguns casos, o efeito citopático. A infecção depende de diversos factores: a quantidade de partículas virais, susceptibilidade da célula hospedeira e a probabilidade do vírus encontrar e interagir com o receptor. Desse modo, o analista deve ser informado sobre a doença ou o vírus suspeito, para que se possa utilizar o melhor método de detecção. Nenhum procedimento laboratorial ou neste caso, nenhuma cultura celular vai ser eficiente se a amostra não for colhida, transportada, armazenada e processada da melhor forma possível. Desse modo a escolha da amostra e o período de recolha é muito importante. Depois da recolha, o transporte da amostra para o laboratório deve, se possível, ser realizado no frio, para evitar a inactivação do vírus por acção do calor. Após o isolamento do vírus, nalguns casos procede-se à realização de provas serológicas como é o caso do *Poliovírus*, *Coxsackievírus*, *Echovírus* e *Hepatovírus*. Existem diversos procedimentos disponíveis, no entanto os que se utilizam no caso dos Picornavírus são as provas de neutralização, fixação do complemento e Elisa (Levy, 2004).

A prova de fixação do complemento baseia-se na pesquisa de anticorpos presentes no soro do doente, quando em contacto com uma solução conhecida de antigénios. Caso a amostra contenha anticorpos, estes vão ligar-se ao antigénio formando um complexo anticorpo-antigénio. A seguir adiciona-se o complemento, que só se fixa se existir o complexo (Scribd, 2007).

A prova de neutralização baseia-se no bloqueio de enzimas ou toxinas através da reacção anticorpo-antigénio, levando ao bloqueio da actividade e infecciosidade dos microorganismos em cultura. Os efeitos nocivos de um antigénio são bloqueados por anticorpos específicos. Os anticorpos ao ligarem-se ao antigénio neutralizam os efeitos deste último e, desta forma, as células não são danificadas. Conhecendo os anticorpos específicos contra determinado vírus, é possível usar esses anticorpos para identificar doenças virais ou para determinar o título dos anticorpos e dos vírus (Scribd, 2007).

A ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) é um método semelhante à imunofluorescência. Este método utiliza uma enzima e um substracto, que muda de cor sob acção dessa enzima. A leitura é realizada visualmente ou com o auxílio dum espectrofotómetro. Hoje em dia, os sistemas ELISA são largamente usados nos laboratórios de Microbiologia, permitindo a detecção semi-automática e muito sensível de antigénios ou anticorpos em relação a um vasto número de agentes infecciosos tais como, os vírus. Este apresenta uma boa sensibilidade (Scribd, 2007).

O PCR é uma técnica que permite a amplificação de sequências genéticas. É um processo semi-automatizado, que nos permite uma amplificação fácil, rápida e selectiva para os fragmentos. Para desenvolver uma reacção de PCR necessitamos apenas conhecer a sequência que se pretende amplificar. Existem vários métodos, neste caso específico realizam-se o Nested-PCR e Transcriptase Reversa PCR. O Nested-PCR utiliza dois conjuntos de primers de amplificação. A grande vantagem do diagnóstico consiste no tempo necessário para efectuar o teste (cerca de 6 horas). Para além disso, obtêm-se uma melhor sensibilidade e especificidade nesta técnica quando comparada com a PCR. No caso do RT PCR, o primeiro passo da reacção consiste na síntese de uma cadeia de cDNA (DNA complementar) utilizando como molde uma cadeia de RNA. Este reacção que é catalisada por uma transcriptase reversa. Os primers são

inespecíficos e nunca aos pares. Após este ciclo, obtém-se o cDNA que será utilizado na PCR (Videira, 2001).

De todos os métodos acima descritos os métodos clássicos apresentam uma aplicabilidade reduzida e um longo tempo de resposta. Por isso habitualmente opta-se pelo PCR uma vez que este método é mais rápido, prático, sensível, específico e possibilita detectar um largo espectro de vírus. Para além disto necessita apenas de uma pequena quantidade de amostra quando comparado com as provas serológicas ou o isolamento (Semler et al, 2002).

3.2 *Enterovírus*

3.2.1 *Poliovírus*

Quando se suspeita de uma infecção causada por *Poliovírus* pode proceder-se de diversas maneiras, através do isolamento de vírus, provas serológicas ou o PCR, que neste momento é o método mais utilizado (Murray et al, 2007; Semler et al, 2002).

O isolamento foi o método mais utilizado durante muito tempo, no entanto este requer um técnico especializado e o procedimento, pode ser bastante moroso. Por outro lado a utilização de culturas celulares caiu em desuso uma vez que não existe uma linha celular específica. As provas serológicas que são efectuadas neste caso são as provas de neutralização e as de fixação do complemento (Semler et al, 2002).

Os produtos biológicos normalmente pedidos quando se suspeita de uma infecção por *Poliovírus* são: fezes, exsudados da orofaringe, soro e por vezes LCR (Semler et al, 2002; Murray et al, 2007; Wilson et al, 2001).

3.2.2 *Coxsackievírus e Echovírus*

Em infecções por *Coxsackievírus e Echovírus* os produtos biológicos utilizados numa infecção aguda são as fezes e exsudados da garganta. No caso de meningite é utilizado o LCR. O método de detecção efectuado é habitualmente é o PCR, pelas

razões referidas em 3.1. É possível também realizar as mesmas provas serológicas efectuadas no caso da poliomielite e em muitos casos a pesquisa de IgM e IgG facilita o diagnóstico (Ferreira et al, 2002; Wilson et al, 2001).

3.2.3 Rhinovírus

Quando se suspeita de uma infecção por *Rhinovírus*, o diagnóstico só é realizado no caso de complicações secundárias. O método praticado é habitualmente o PCR uma vez é bem mais rápido que as culturas celulares. Os testes serológicos e a detecção rápida de antígenos também são uma opção, que no entanto é muito dificultada pela multiplicidade dos serótipos (Hunt, 2010; Semler et al, 2002; Wilson et al, 2001).

3.3 *Hepatovírus*

Como meio de diagnóstico, em infecções por *Hepatovírus*, podem realizar-se dois métodos. O método indirecto é aquele que se faz por rotina, neste procede-se à pesquisa de anticorpos anti-HAV da classe IgM. Estes podem ser pesquisados logo após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença ou seja, passado mais ou menos 3 a 5 semanas após a infecção. A detecção de anti-HAV IgM 6 meses após o início dos sintomas indica uma infecção aguda. Quando é detectado anti-HAV IgG significa que o indivíduo já esteve em contacto com o vírus e que ganhou imunidade, uma vez que estes anticorpos permanecem para toda a vida. No que diz respeito ao método directo é realizado apenas em laboratórios muito específicos, este pode ser feito através do isolamento viral. No entanto não é muito utilizado devido à taxa de isolamento ser bastante baixa. No método directo pode também recorrer-se à imunomicroscopia electrónica a partir das fezes do indivíduo (Ferreira et al, 2002; Murray et al, 2007; Roche, 2010; Wilson et al, 2001).

IV-Tratamento

Uma vez que não existe qualquer tipo de terapia antiviral aprovada, a única forma de combater a infecção é a utilização de vacinas no caso da Poliomielite e Hepatite A e, quando necessário, o tratamento sintomatológico, uma vez que a maior parte das infecções tem resolução espontânea (De Palma et al, 2008).

4.1 Tratamento Sintomático

O tratamento sintomático é a terapêutica mais utilizada, uma vez que não existe ainda, no mercado nenhum fármaco específico para o tratamento de infecções por Picornavírus. A maioria das infecções cura-se espontaneamente, necessitando apenas de uma terapêutica sintomatológica. Assim sendo, no caso de infecções por *Rhinovírus* é necessário por vezes, recorrer à utilização de anti-histamínicos. O uso de antibióticos não é benéfico, excepção feita a casos de coinfeção com *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *Moraxella catarrhalis* (Semler et al, 2002).

4.2 Tratamento específico

Para desenvolver um antiviral eficaz é necessário saber qual o melhor alvo para impedir o início do processo de replicação. Assim sendo, foram estudadas várias estratégias, nomeadamente o bloqueio da interacção vírus-receptor, desencapsulação, replicação do RNA viral, síntese de proteínas virais ou a susceptibilidade da célula. Contudo a procura de um antiviral eficaz ainda se encontra em fase de estudo, apesar de já existirem algumas moléculas promissoras. (Rotbart, 2002).

4.2.1 Vacinas

Devido ao carácter endémico das infecções por Picornavírus, as vacinas surgem como uma arma eficaz contra estes vírus, nomeadamente o *Poliovírus* e o *Hepatovírus*. Quando se pretende proceder à vacinação de uma população cujo risco de infecção é elevado faz-se um teste de pré-vacinação para evitar os elevados custos e a vacinação de pessoas que já adquiriram imunidade anteriormente (Hunt, 2010).

A produção de uma vacina contra o *Hepatovírus* foi simplificada pela existência de apenas um serótipo deste vírus. Assim sendo, em 1978, foi descrita a primeira vacina inactivada por Provost e Hilleman, no entanto só em 1992 é que se pôde concluir a sua imunogenicidade e protecção. A partir desta altura a vacina começou a ser comercializada em todos os países, incluindo Portugal. As duas vacinas existentes no mercado são a HAVRIX® e Vaqta®, as quais são administradas por via intramuscular no deltóide em 3 tomas (0, 2 e 6 meses). Ambas estão disponíveis em doses diferentes, uma para crianças que vai dos 2 até aos 16 anos e outra a partir dos 18 anos. Não apresenta efeitos secundários graves, apenas uma ligeira dor no local da picada, mal-estar e dor de cabeça. Relativamente à possibilidade de toma por parte das grávidas e indivíduos imunocomprometidos, não está contra indicada em nenhuma dessas situações, uma vez que o vírus se encontra na sua forma inactiva e não possui nenhum requisito ou condição especial. A vacina está contra indicada para indivíduos que sejam alérgicos a algum dos constituintes da vacina. Se for observado uma reacção alérgica após a primeira toma, não se deve proceder à toma das seguintes doses (Hunt, 2010; Ferreira et al, 2002).

A melhor maneira de combater a Poliomielite é a administração da vacina, uma vez que confere imunidade e protecção em caso de contacto com o vírus “selvagem”. A primeira vacina disponível foi a Salk que consistia no vírus inactivado com formaldeído. Após a introdução desta no mercado o número de casos de Poliomielite diminuiu. No entanto, devido à dificuldade na sua produção e ao aparecimento da vacina atenuada, a Salk caiu em desuso e foi substituída pela Sabin. As vacinas atenuadas contêm o vírus vivo, no entanto passam por diversas etapas em condições especiais, levando à perda da sua neurovirulência, e desse modo adquirem segurança na sua utilização Tanto a Salk como a Sabin necessitam de doses de reforço e essas são administradas segundo o plano de vacinação em vigor nos diferentes países. Em Portugal, segundo o Plano Nacional de Vacinação em vigor desde 2008, deve proceder-se à administração da vacina contra o *Poliovírus* aos 2, 4 e 6 meses (Ferreira et al, 2002; Hunt, 2010; Jesus, 2007; Portal da Saúde, 2008).

4.2.2 Inibidores da fixação, entrada e desencapsulação

A primeira etapa do processo de replicação viral refere-se à interacção do vírus com o receptor da célula hospedeira (Figura 1.1). Alguns picornavírus têm a capacidade de se ligar a receptores diferentes (Tabela 1), provocando uma inibição da acção dos agentes antivirais (Chen et al, 2008).

4.2.2.1 Compostos Win

No passado, foram desenvolvidos diversos compostos pela empresa Sterling-Winthrop, ficando estes conhecidos como compostos Win. Entre os quais se descobriu o Pleconaril que demonstrou eficácia no tratamento de infecções por Picornavírus (De Palma et al, 2008).

Foi graças a um estudo relativo à síntese de uma hormona juvenil, que se descobriu os compostos Win. A partir do intermediário β -dicetona (Figura 4.A) e após algumas modificações com vista à melhoria da sua actividade foi desenvolvida a arildona ou WIN38020 (Figura 4.B). Este composto tanto *in vitro* como *in vivo* demonstrou capacidade para inibir a replicação do *Poliovírus*, por bloqueio da desencapsulação. No entanto *in vivo* provocava paralisia e morte do rato. Com o objectivo de melhorar a actividade do WIN38020 foi desenvolvido um novo composto, o disoxaril (Figura 4.E). Este demonstrou ser um potente inibidor contra *Rhinovírus* e *Enterovírus*, apresentando valores de concentração mínima inibitória entre os 0,004 e 6,2 μ g/ml. Num estudo utilizando ratos infectados com o *Poliovírus* e o HRV-2 demonstrou-se que o disoxaril e alguns análogos apresentavam capacidade de inibir a desencapsulação do virião. Apesar da actividade *in vivo* e *in vitro* demonstrada pelo disoxaril contra algumas estirpes de HRV, verificou-se que nalguns casos este apresentava uma baixa biodisponibilidade (cerca de 15%) e que provocou cristalúria na fase I dos ensaios clínicos. Por estas razões foram desenvolvidos esforços no sentido de procurar um novo composto com uma biodisponibilidade maior, mais potente e com um largo espectro de acção, tendo surgido o composto WIN 54954 (figura 4.F). Num estudo utilizando ratos infectados com CVB, foi administrado por via oral o composto WIN 54954, numa dose de 50 mg/kg/dia, tendo-se verificado uma diminuição da

replicação viral e das lesões inflamatórias no pâncreas. No caso de infecções causadas pelo CVB9, este composto quando administrando em doses superiores a 100 mg/kg/dia causava toxicidade neurológica. O composto WIN 54954 foi bem tolerado na fase I dos ensaios clínicos e eficaz no tratamento de infecções em humanos por CVA21. No entanto quando experimentado em infecções provocadas pelo *Rhinovírus* 23 e 29, essa actividade é reduzida. Posteriormente o composto tornou-se desinteressante uma vez que demonstrou ser rapidamente metabolizado e induzir hepatite reversível (Diana et al, 1977, 1978 e 1985; Florea et al, 2003).

Na fase final do estudo, para desenvolver um composto WIN eficaz do ponto de vista clínico, procedeu-se à substituição do anel oxazolínico, já que se suspeitava que este era responsável pela rápida metabolização e conversão em diversos produtos que não apresentavam qualquer tipo de acção antiviral. Assim sendo, surgiu o análogo WIN 61893 (Figura 4.G), o qual demonstrou ser bastante potente, contudo nos estudos de metabolização não preencheu todos os requisitos. Sendo assim, substitui-se o grupo metil por um grupo trifluormetil (Figura 4.H), o que se traduziu numa redução drástica da taxa de metabolização, levando à descoberta do composto WIN 63843, mais conhecido por Pleconaril. O Pleconaril mostrou uma melhoria do tempo de semi-vida quando administrando por via oral em estudos realizados com cães numa dose de 10mg/kg. Este composto demonstrou eficácia em infecções por *Enterovírus* e *Rhinovírus*. Sendo assim, em 1996 os laboratórios ViroPharma disponibilizaram a droga para uso exclusivo em pacientes com miocardites, meningoencefalites ou sépsis neonatal. Relativamente aos dados recolhidos pelos estudos farmacocinéticos verificou-se que com uma dose de 5,0 mg/kg de 8 em 8 horas em recém-nascidos que se encontravam hospitalizados devido a uma hepatite grave causada por *Enterovírus* em 3 casos hospitalizados apenas 2 obtiveram melhoria do seu estado. No caso de pacientes hospitalizados com meningoencefalite crónica, em cerca de 78% dos casos verificou-se o sucesso da terapêutica e os efeitos adversos foram mínimos. Contudo em 2002, a utilização do Pleconaril nos casos das constipações foi recusada pela US FDA (Food and Drug Administration), alegando a não segurança do mesmo, apesar de este ter chegado à Fase II dos ensaios clínicos. Foi verificado que este interferia com alguns medicamentos, incluindo os contraceptivos orais. Contudo foram ainda observados alguns efeitos adversos tais como problemas gastrointestinais, aumento do colesterol

sérico e hemorragias menstruais em mulheres a tomar contraceptivos orais. Mais tarde em 2007, o pleconaril finalizou a Fase II, que tinha como objectivo verificar a eficácia de um spray nasal com a substância, em pacientes com gripe e exacerbação da asma (De Palma et al, 2008; Gwaltney, 2002; Pevear et al, 1999).

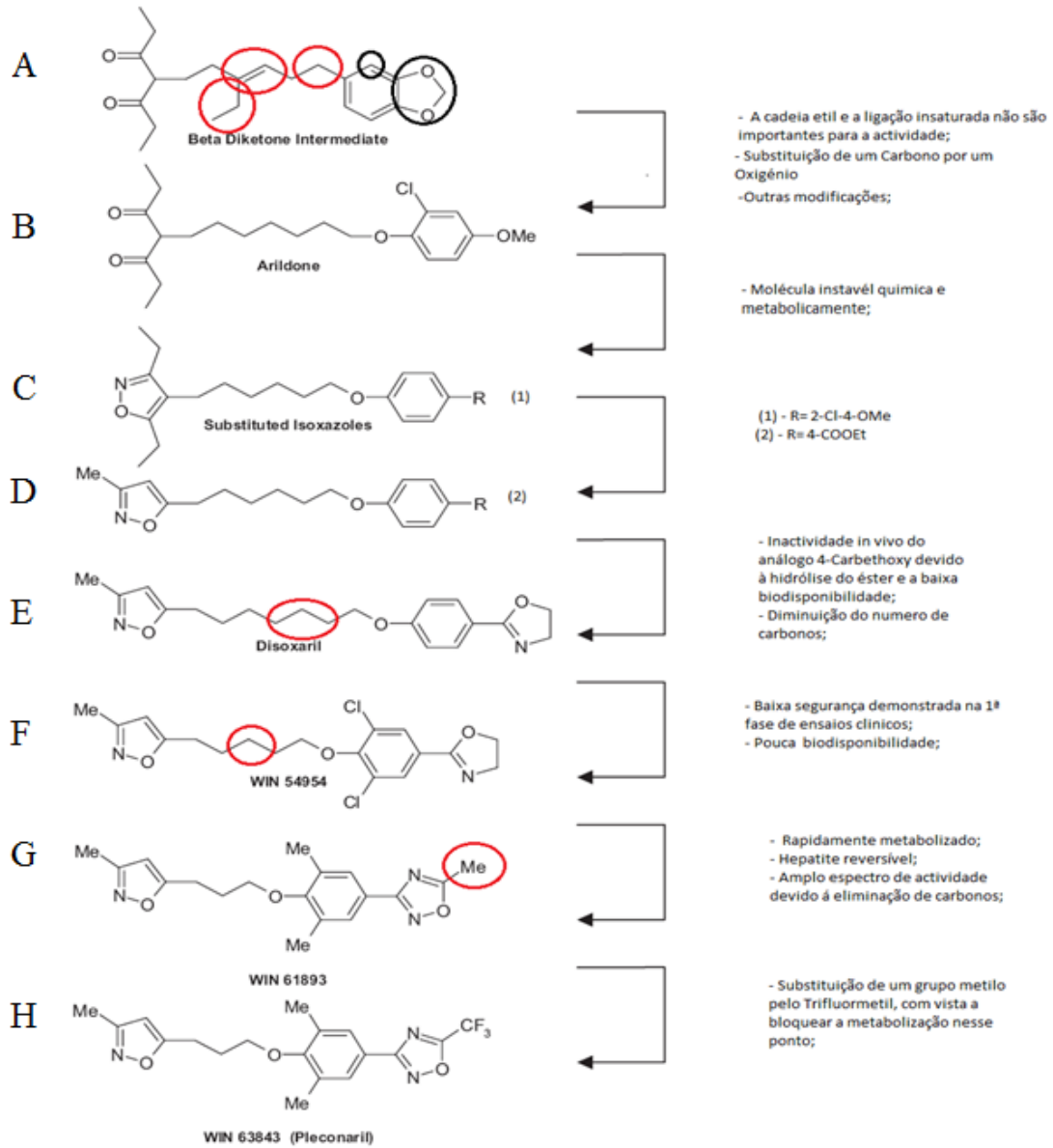


Figura 4: Etapas do desenvolvimento do Pleconaril (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.2 R618737, Pirodavir e Eter oximas relacionados

O Pirodavir (Figura 5.B) e R618737 (Figura 5.A) são derivados pirazínicos e foram desenvolvidos pela Janssen Research Foundation. O Pirodavir demonstrou ser 500 vezes mais potente que o R618737 *in vitro*, apresentando uma percentagem de inibição que ronda os 80% do *Rhinovirus A* e *B*, numa concentração inferior a 0,064 mg/ml. Já o R618737 apenas se revelou eficaz contra o *Rhinovirus B*. Em ambos os casos, estes compostos, interagem directamente com as proteínas da cápside (Andries et al, 1992 e 1989; Moeremans et al, 1992).

Numa série de estudos realizados com o composto R61837, este demonstrou ser eficaz no tratamento profiláctico e supressão de constipações em voluntários humanos infectados por *Rhinovirus 9*. Realizou-se um estudo que pretendia avaliar a eficácia da utilização deste composto por via intranasal, numa dose entre 25 a 36 mg, durante um período de 4 a 6 dias, tendo-se verificado uma redução significativa de vírus na secreção nasal. No caso do Pirodavir também foi avaliada a sua eficácia quanto à possível utilização por via nasal, chegando-se à conclusão que não se obtinha qualquer benefício clínico e tendo-se verificado ainda algumas sensações desagradáveis durante o tratamento. A baixa eficácia clínica deve-se à sua baixa solubilidade em água, que por sua vez resulta na hidrólise rápida do éster no seu ácido correspondente. Com o intuito de ultrapassar este problema foram sintetizados diversos análogos do Pirodavir, surgindo o composto BTA-188 (Figura 5.D) e o BTA- 39 (Figura 5.C). Ambos, em laboratório inibiram cerca de 56 estirpes de HRV, com valores de EC₅₀ que rondam 0,5 a 6,7 nM. Com o objectivo de verificar a actividade antiviral do composto BTA-188, procedeu-se à substituição do benzaldeído da oxima por 2-etoxibenzoxazole. Surgiram assim 20 análogos que foram avaliados quanto à sua potencial actividade antiviral. Dentro destes, o composto 13 (Figura 5.E) demonstrou ser o mais potente, dez vezes mais activo que o pleconaril e ainda estava previsto apresentar um melhor tempo de semi-vida e uma biodisponibilidade oral maior, uma vez que possui uma maior estabilidade hidrolítica. Em Agosto de 2010, o composto BTA-798, que foi desenvolvido para o tratamento e prevenção de infecções por *Rhinovirus* em pacientes com asma e com risco de Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica, entrou na fase II dos

ensaios clínicos, prevendo-se que esta termine em Março de 2011 (al Nakib et al, 1989; Barnard et al, 2004; ClinicalTrialsFeeds, 2010;Hayden et al, 1995).

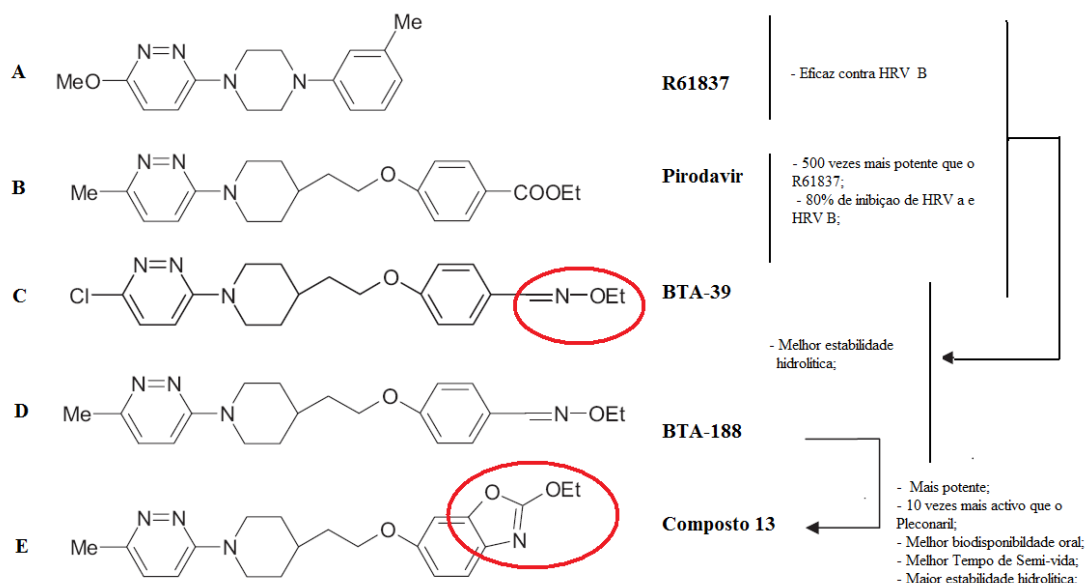


Figura 5: R618737, Pirodavir e Eter oximas relacionados (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.3 Derivados do isoxazol

Devido à inactividade do Pleconaril contra estirpes de CVB3, foram sintetizados novos análogos derivados do isoxazol. Nos testes *in vitro* estes compostos demonstraram uma excelente actividade contra HRV-2 mas não contra estirpes de HRV-14. De todos os análogos, o composto Via (Figura 6.A) demonstrou ser o mais potente, apresentando valores de EC_{50} de 9 mg/ μ L no caso do HRV2 e EC_{50} de 1,34 μ g/mL para o CVB3. Em 2007 foi realizado um estudo com o objectivo de analisar a relação entre a estrutura-actividade de alguns análogos. Para tal, foram escolhidos 17 análogos do Pleconaril, dos quais surgiram 18 novos compostos que apresentavam actividade antiviral. Foi então estudada a actividade *in vitro* de três dos compostos o composto 19, 20 e 21 (Figura 6.B) contra infecções causadas pelo HVR-2, chegando-se à conclusão que o composto 19 se mostrou o mais potente (De Palma et al, 2008; Kuz'min et al, 2007; Makarov et al, 2005).

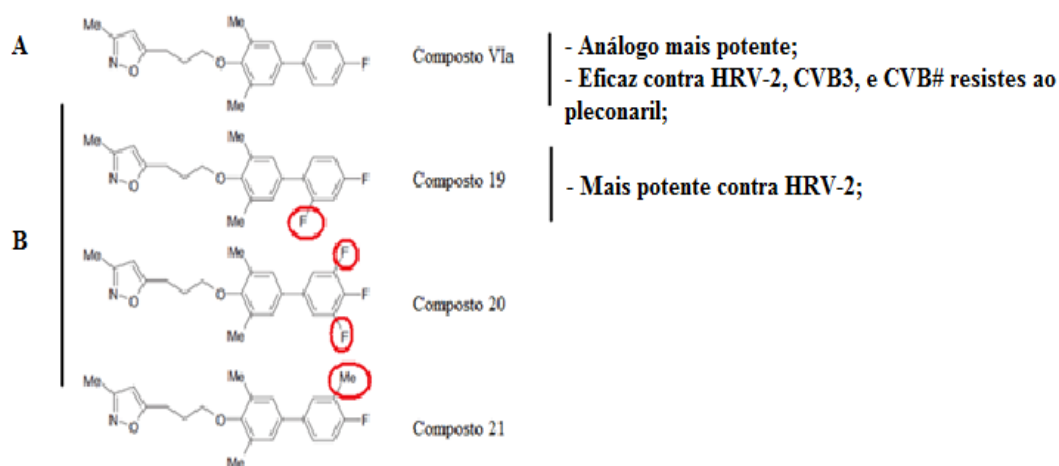


Figura 6: Derivados isoxazol (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.4 Piridil Imidazolidinonas

Uma vez que o Pleconaril não demonstrou capacidade para neutralizar o efeito citopático induzido pelo *Enterovírus 71*, foram utilizados os compostos Win, incluindo o Pleconaril, como modelos para o desenvolvimento de uma nova série de compostos. Para tal, realizaram-se estudos de relação estrutura-actividade, os quais demonstraram a importância de um substituto na posição para do fenol (Figura 7.A-1) e da piridina (Figura 7.A-2) contendo a imidazolidinona. O composto BPR0Z-194 (Figura 7.A) demonstrou uma potente actividade antiviral contra diversos Picornavírus tais como, *Enterovírus 71* e *68*, *Coxsackievírus A9* e *A24* e *Echovírus 9*. No entanto os vírus conseguiram ganhar facilmente resistência a este composto pela simples alteração de um aminoácido na posição 192 da proteína viral VP1. Assim sendo procedeu-se à síntese do composto DBPR 103 (Figura 7.B), no qual foi introduzido o 4-clorofenil (Figura 7.B-3) que melhorou a actividade. Com o objectivo de melhorar o espectro de acção e a sua potência foram sintetizados uma série de novos compostos através da introdução de algumas modificações, com vista à melhoria da actividade, principalmente contra os *Enterovírus* e reduzir a actividade inibitória. De todos os análogos o mais potente é o composto 28b (Figura 7.E), uma vez que é selectivo para o EV71, *Coxsackievírus A* e, *Echovírus 9* e *28* e *Rhinovírus 2* e *14* (De Palma et al, 2008; Shih et al, 2004).

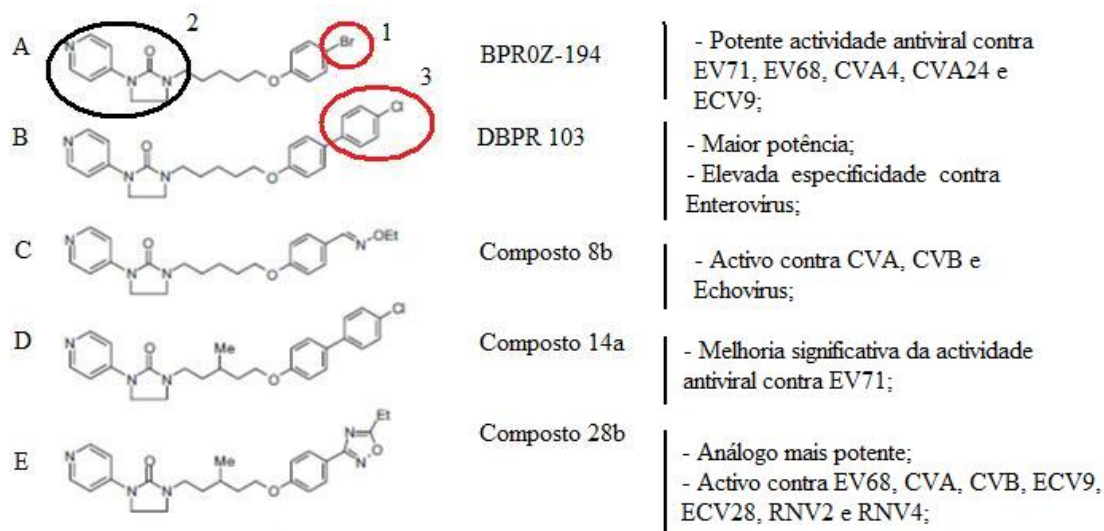


Figura 7: Derivados do Piridil imidazolidinonas (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.5 SCH 38057, SCH 47802 e SCH 48973

O composto SCH 38057 (Figura 8.A) é solúvel em água, demonstrou actividade antiviral contra vários *Enterovirus* e *Rhinovirus*, com valores de EC_{50} entre 10,2 – 29,1 μ M. Em estudos realizados com ratos infectados pelo CVB3 e *Echovirus 9*, os quais foram submetidos a um tratamento por via oral, numa dose de 60 mg/kg e sistémico, numa dose de 20 mg/kg, conclui-se que estes protegiam os animais. Estes actuam por inibição da desencapsulação. Surgiram então outros compostos, entre eles o SCH 47802 (Figura 8.B) que demonstrou uma actividade antiviral potente contra *Poliovirus*, *Echovirus* e *Coxsackievirus*. Este composto foi testado em ratos com encefalite causada pelo *Poliovirus*, o qual foi administrado por via oral numa dose de 60 mg/kg/dia impedindo a morte do animal. Utilizando um outro análogo o SCH 48973 (Figura 8.C) verificaram-se resultados semelhantes. Todavia esta droga apresentou eficacia numa dose inferior. Relativamente aos outros cinco análogos, o único que demonstrou alguma actividade foi o composto SCH 48974 utilizando uma dose de 90 mg/kg/dia. Foram realizados estudos com o objectivo de descobrir a fase em que estes compostos actuam, chegando-se à conclusão que estes intervinham na fase de interacção do receptor celular com a cápside (Buontempo et al , 1997; Cox et al, 1996; Rozhon et al, 1993).

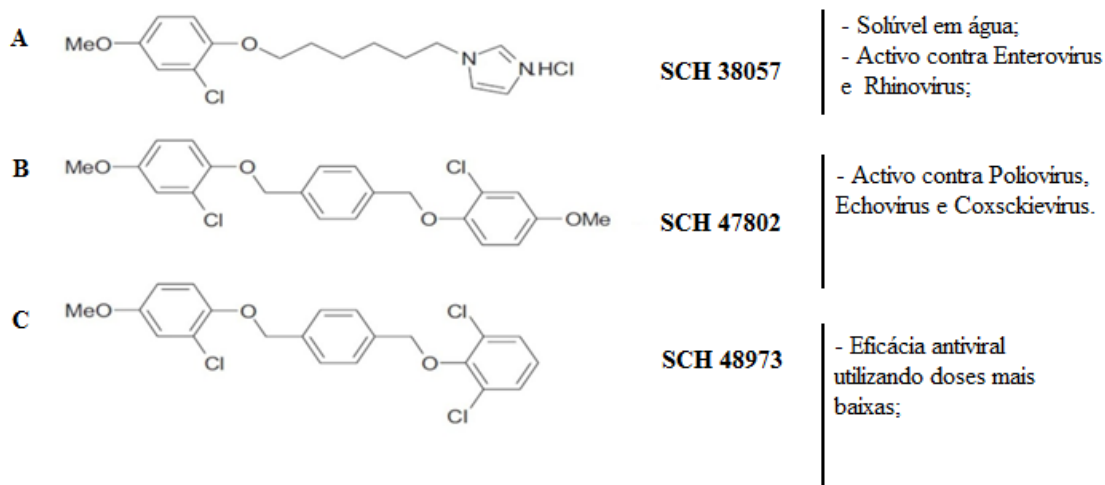


Figura 8: Compostos desenvolvidos pela Schering- Plough (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.6 SDZ 35-682 e SDZ 880-061

A partir do composto R61837 (Figura 5.A) e após algumas modificações químicas surgiu o composto SDZ 35-682. Este, apresenta um espectro de actividade relativamente limitado contra alguns *Rhinovirus* e *Echovirus 9*. Em estudos relacionados com o modo de actuação verificou-se que o SDZ 35-682 (Figura 9.A) impedia a desencapsulação do *Echovirus 9* e a ligação à célula do hospedeiro. Num estudo realizado *in vivo*, com um animal infectado com o *Echovirus 9* e utilizando o composto SDZ 35-682, foi demonstrada a sua eficácia quanto ao impedimento de doença paralítica e possível morte, com doses nos dois primeiros dias de 126 mg/kg e nos restantes dias de 36 mg/kg (De Palma et al, 2008; Rosenwirth et al, 1995).

Quanto ao SDZ 880-061 (Figura 9.B) demonstrou ser eficaz, em concentrações inferiores a 3 µg/ml, uma vez que inibiu cerca de 85% das infecções causadas por diversos serótipos do vírus *Rhinovirus*. Nos estudos relativos ao mecanismo de acção foi possível constatar que este também actua ao nível da ligação com a célula do hospedeiro (De Palma et al, 2008).

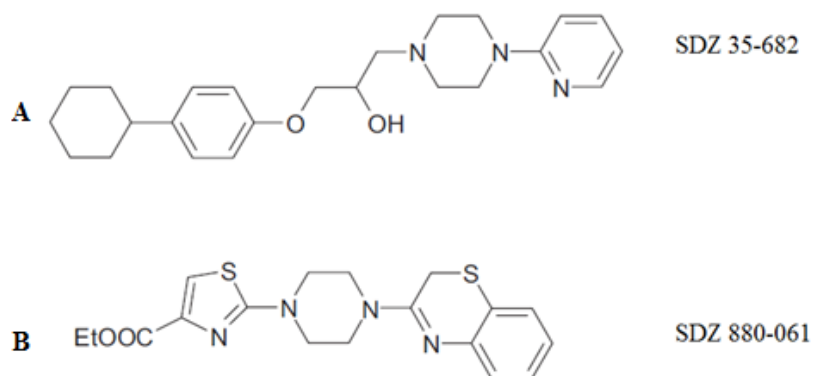


Figura 9: Compostos desenvolvidos pela Sandoz Forschungsinstitut (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.7 Chalconas

O composto Ro 09-0410 (Figura 10.A), demonstrou eficácia contra infecções causadas por *Rhinovírus*, todavia quando testado com outros Picornavírus não apresentou qualquer tipo de actividade. Estudos realizados com o composto e seus análogos (Figura 10.B), contribuíram para a identificação de análogos de amidas como é o caso dos compostos Ro 09-0696 e Ro 09-0881, que demonstraram ser 10 vezes mais eficazes contra infecções por *Rhinovírus*. A explicação para tal facto, deve-se à forma de ligação específica à cápside do *Rhinovírus*. No entanto quando realizados testes em humanos a terapêutica com Ro 09-0410 falhou tanto por administração oral como intranasal (al Nakib et al, 1987; Phillipotts et al, 1984).

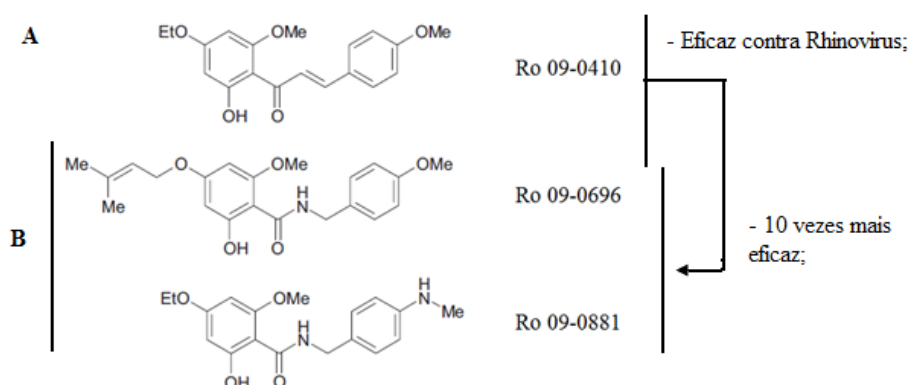


Figura 10: Chalconas (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.8 BW 683C e análogos

O composto BW 683C (Figura 11) mostrou eficácia contra infecções provocadas por *Rhinovírus*, com valores de EC_{50} entre os 7 e os 170 nM. Estudos realizados em voluntários humanos, os quais utilizaram o composto por via oral, numa dose de 1mg/kg 3 vezes ao dia ou por via intranasal, com doses de 40 mg 5 vezes ao dia, verificou-se que este não conseguiu proteger os voluntários, contudo a droga demonstrou uma boa disponibilidade oral. Deste modo, procedeu-se à substituição do halogéneo Cloro (Figura 11.B-2) por Cianeto (Figura 11.A-1) resultando no análogo 4',6- Dicianoflavan (Figura 11.B). Este demonstrou uma maior eficácia contra *Rhinovírus IB* quando comparado com o composto de referência (Figura 11.A), apresentando um valor de IC_{50} de 23nM. Tanto um como outro interferem com alguns passos de replicação do *Rhinovírus*. Um outro análogo do BW 684C é o composto 3(2H)-isoflaven, o qual apresenta um espectro de acção mais amplo. Inicialmente pensava-se que este composto actuava entre a fase de desencapsulação e a síntese de RNA viral. Mais tarde, através de estudos realizados com vírus resistentes que continham mutações ao nível da proteína viral VP1, pôde concluir-se que este composto impedia a desencapsulação (Conti et al, 1992; De Palma et al, 2008; Salvati, 2004; Tsidale et al, 1983).

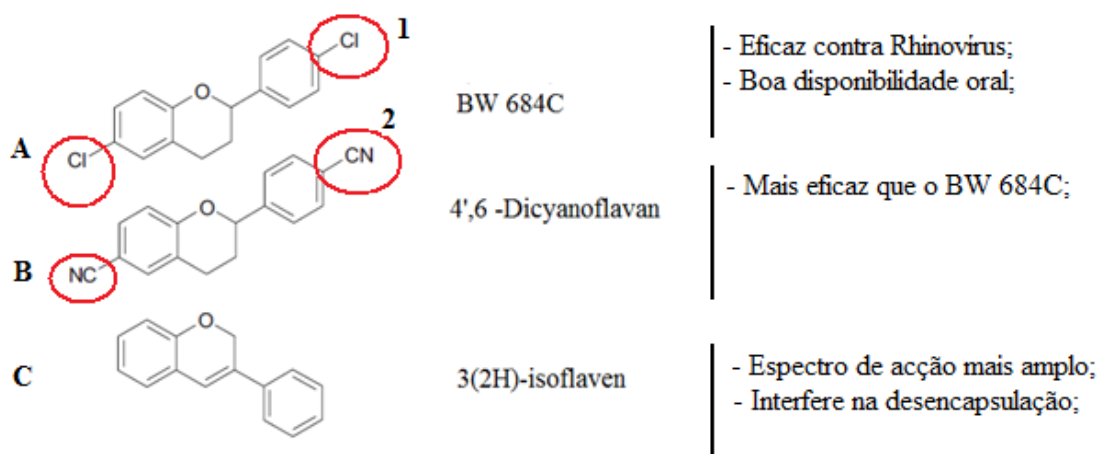


Figura 11: BW 683C e análogos (Adaptado de: De Palma, A.M. et al, 2008).

4.2.2.9 Rodanina

A Rodanina (Figura 12) demonstrou eficácia apenas contra o *Echovírus 12*, quando utilizada numa concentração de 12,5 µg/ml. Este composto actua por inibição da desencapsulação. (De Palma et al, 2008).

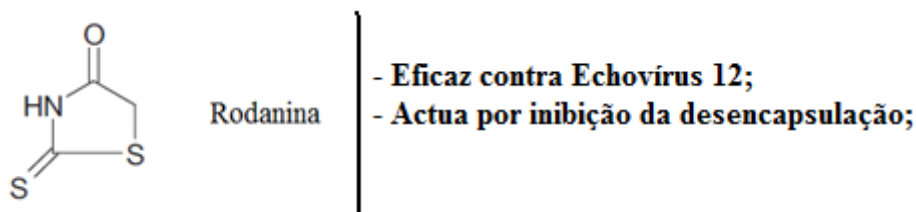


Figura 12: Rodanina (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.10 44 081 RP

Num estudo realizado, com 69 amostras, o composto 44 081 RP (Figura 13) demonstrou capacidade de inibir cerca de 39% dos serótipos de *Rhinovírus* testados numa concentração de 7 µg/ml. Este actua por inibição da etapa da desencapsulação. Apesar da actividade *in vitro* demonstrada, o composto 44 081 RP não apresentou eficácia clínica quando administrado por via intranasal (Alarcon et al, 1986; De Palma et al, 2008).

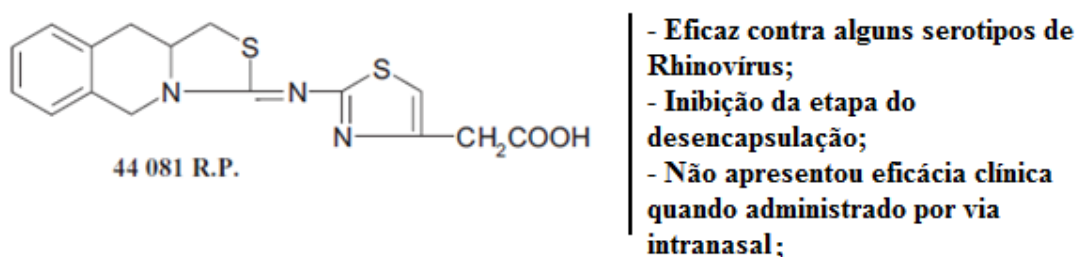


Figura 13: 44 081 R.P. (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.11 Dibenzofurano e derivados do Dibenzosuberol

Em estudos realizados com Dibenzofurano e derivados do Denzosubrol (Figura 14) verificou-se que estes eram eficazes contra o HRV-14 e HRV-16, com valores de

EC₅₀ entre 10 µM a 30 µM. No entanto, após o passo de adsorção, estes perdiam a actividade (De Palma, A.M. et al, 2008; Murray et al, 1999).

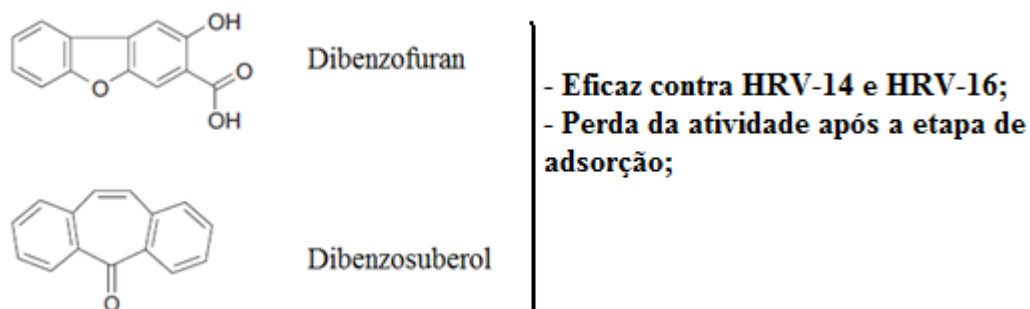


Figura 14: Dibenzofurano e Dibenzosuberol (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.12 MDL 20,610 e análogos

Os compostos MDL 20 610, MDL 20 646, MDL 20 957 (Figura 15), demonstraram actividade contra 32 serótipos de *Rhinovírus*, com EC₅₀ de 0,03 µg/ml, 0,006 µg/ml e 0,006 µg/ml respectivamente. Estes actuam por interferência directa com a ligação do vírus à cápside, o que leva ao impedimento da desencapsulação (Kenny et al, 1986 e 1988; Markley et al, 1986).

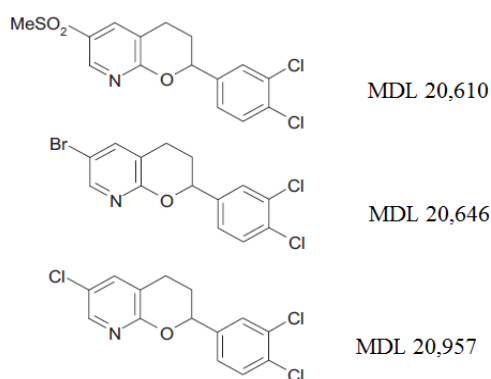


Figura 15: MDL 20,610 e análogos (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.13 Fenoxibenzeno, Fenoxipiridinas e análogos

Foram sintetizados vários análogos dos compostos de fenoxibenzeno e fenoxipiridinas, os quais demonstraram actividade contra picornavírus. De todos os

compostos, o MDL-860 (Figura 16.A) quando utilizado numa concentração de 1µg/ml inibiu 80% das estirpes de *Rhinovírus* e *Enterovírus* testados. Também *in vivo*, este composto demonstrou eficácia, uma vez que protegeu o rato infectado com o *Coxsackievírus B3* e *A21*. Outro composto que revelou também alguma potencialidade foi o Composto 71 (Figura 16.B) que demonstrou ser eficaz apenas contra o *Rhinovírus*. Quanto ao modo de acção o Composto 71 impede a desencapsulação viral, enquanto o composto MDL-860 actua nas etapas iniciais da replicação, antes da desencapsulação viral. O composto 71 foi utilizado como modelo para a síntese de novos compostos, por substituição da ponte de ligação de oxigénio (Figura 16.B-1). Dessa nova síntese surgiram então o composto 13 (Figura 16.C) e 21 (Figura 16.D) que apresentavam uma actividade *in vitro* similar. No entanto o composto 21 destaca-se na sua eficácia *in vivo*, uma vez que protegeu o rato contra o *Coxsackievírus A21* (De Palma et al, 2008; Powers, 1982).

Com o objectivo de impedir a toxicidade associada aos compostos nitro aromáticos, foi sintetizada uma nova série de compostos fenoxipiridinacarbonitrilos. Foi então seleccionado um composto com base nas suas propriedades *in vivo* e *in vitro*, para uma avaliação futura. O composto escolhido foi DPEC (Figura 16.E), com base em estudos preliminares sobre o seu mecanismo de acção indicaram que este tinha a capacidade de impedir a desencapsulação viral. Nos ensaios demonstrou a capacidade de inibir CVA21 em ratos numa dose de 37,5 mg/kg/dia. Com o objectivo de aumentar a actividade contra *Enterovírus* foi sintetizada uma nova série de compostos através da substituição do grupo 3,4- dicloro (Figura 16.D-2) por um grupo p-benzoil (Figura 16.E-3). Esta alteração resultou numa diminuição da actividade anti-HRV e melhoria da actividade *in vitro* e *in vivo* contra os restantes *Enterovírus* (De Palma et al, 2008; Gonzalez, 1990).

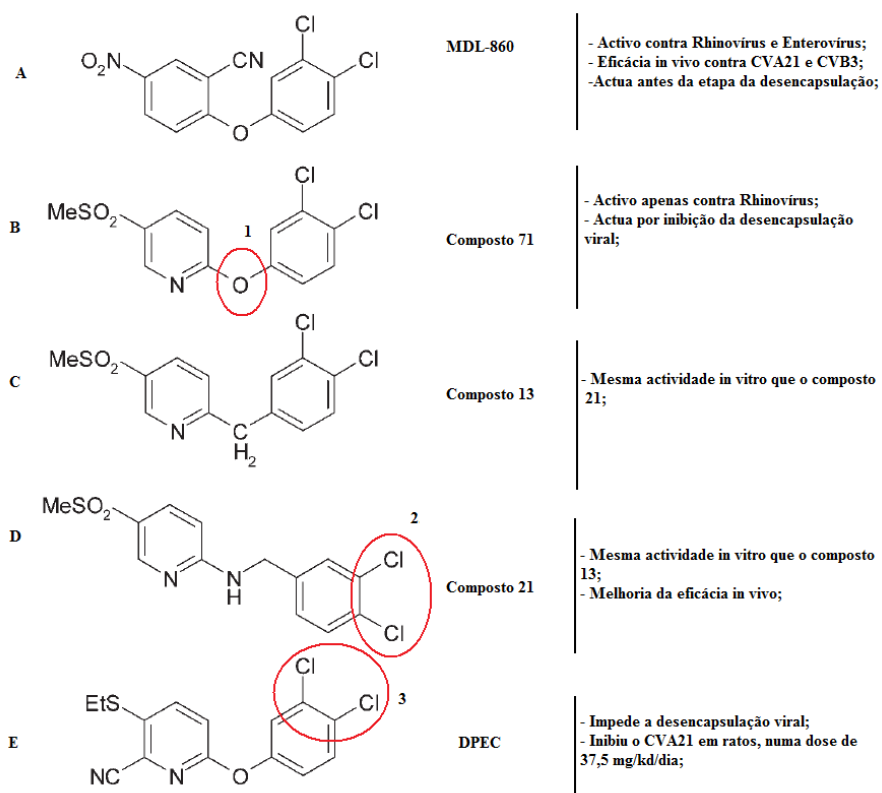


Figura 16: Fenoxibenzeno, Fenoxipiridinas e análogos (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.2.14 Imunoglobulina Sérica Intravenosa

A imunoglobulina liga-se ao vírus impedindo a sua ligação e fixação à célula hospedeira. Verificou-se uma discrepância nos resultados obtidos nos diversos estudos, tal facto se deve à impossibilidade de padronização do fármaco. A sua utilização ocorre nos casos de meningoencefalites por *Enterovirus* em crianças e no controlo da pós-infecção da Hepatite A (Rotbart, 2002).

4.2.2.15 ICAM-1 Solúvel

A maior parte dos serótipos do *Rhinovirus* utiliza como receptor o ICAM-1. Desse modo foi desenvolvida uma forma solúvel do ICAM-1 para o tratamento das constipações. Este liga-se aos viriões do HRV, prevenindo a sua ligação aos receptores naturais. Nos ensaios não se verificaram efeitos adversos e os doentes apresentavam

uma diminuição dos sintomas e da severidade da doença, no entanto os efeitos terapêuticos observados não foram significativos (Gwaltney, 2002; Semler et al, 2002).

4.2.3 Inibidores da Replicação

4.2.3.1 Cloridrato de Guanidina

Dentro da série de compostos que actuam por inibição do processo de replicação o Cloridrato de Guanidina (Figura 17) foi o mais estudado. Isso deve-se à sua capacidade de inibição do processo de replicação de variadíssimos Picornavírus tais como: *Poliovírus*, *FMDV*, *Echovírus* *Coxsackievírus*, no entanto é completamente ineficaz contra o vírus da Hepatite A. Estudos feitos a moléculas de guanidina concluíram que estas tinham capacidade de inibir a síntese de RNA viral, sem interferir com o processo de alongação e libertação de moléculas completas de RNA positivo. Mais tarde foram realizados testes com o objectivo de explicar o sucedido e foi então que se descobriu que este composto interferia com a zona 2C que é necessária para o processo de iniciação da cadeia negativa de RNA, impedindo a replicação de diversos *Picornavírus* a concentrações entre 0,1 mM e 2,0 mM. (Klein et al, 2000; Eggers, 1976; Pincus et al, 1986 , Shimizu et al, 2000; Siegl et al, 1982).

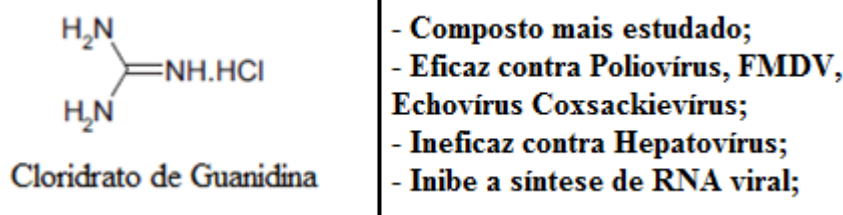


Figura 17: Cloridrato de Guanidina (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.2 HBB

O composto HBB (Figura 18) actua por inibição da replicação de RNA, é activo contra *Poliovírus*, *Coxsackievírus A e B* e *Echovírus*. Este actua na fase de replicação do RNA. Quando associado com o Cloridrato de Guanidina verificou-se uma melhoria do estado do rato com uma infecção de *Echovírus 9* e *Coxsackievírus A9* (Eggers, 1976; Hadaschik et al, 1999; De Palma et al, 2008).

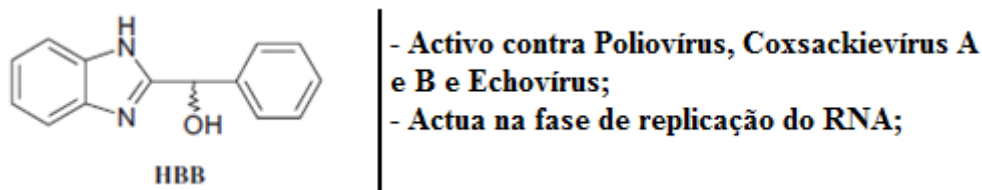


Figura 18: Composto HBB (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.3 MRL-1237

À semelhança dos compostos acima referidos (HBB e cloridrato de guanidina) o MRL-1237 (Figura 19) também tem como alvo principal a proteína 2C dos Picornavírus. A sua actividade *in vitro* demonstrou eficácia contra o *Poliovírus* e *Coxsackievírus B*. Num estudo com diferentes espécies de *Enterovírus*, o composto demonstrou eficácia para todas as espécies, numa concentração de 10 a 200 μM sem exibir citotoxicidade (De Palma et al, 2008; Shimizu et al, 2000).

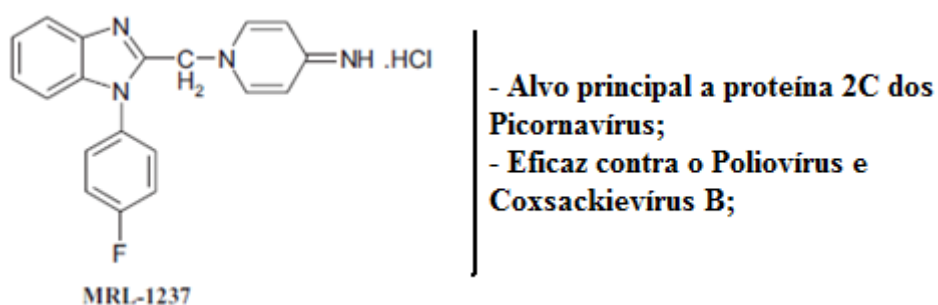


Figura 19: MRL-1237 (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.4 TBZE-029

O TBZE-029 (Figura 20) inicialmente demonstrou actividade para o vírus da imunodeficiência, no entanto mais tarde revelou a sua actividade contra alguns *Enterovírus*, tais como, *Coxsackievírus A9* e *B3*, *Enterovírus 68* e *Echovírus 9* e *11*. O seu modo de actuação, passa pela inibição da replicação viral, tendo como alvo a parte não estrutural da proteína 2C. (De Palma et al, 2007 e 2008).

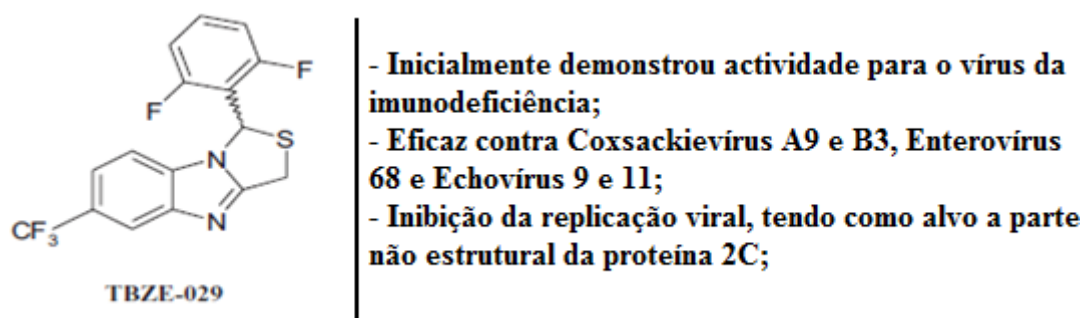


Figura 20: TBZE-029 (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.5 Enviroxima

A Enviroxima (Figura 21.A) é um derivado benzimidazol, que *in vitro* demonstrou actividade contra *Rhinovírus* ($EC_{50}=0,02 \mu\text{g/ml}$) e *Enterovírus*, no entanto a sua eficácia *in vivo* é variável. Num estudo efectuado com algumas amostras de *Enterovírus 70* e *Coxsackievírus A24*, verificou-se inibição do efeito citopático, utilizando doses de Enviroxima entre 0,01 a 0,65 $\mu\text{g/ml}$. Este composto tem como alvo a região codificante da proteína 3A, que se traduz na inibição da replicação de RNA (DeLong et al, 1980; Heinz et al, 1995; Levandowski et al, 1982; Miller et al, 1985; Phillpotts et al, 1983; Wyde et al, 1988).

Durante a fase experimental da Enviroxima verificou-se fraca biodisponibilidade, toxicidade e alguns efeitos secundários tais como, vômitos e dor abdominal quando administrado por via oral e irritação quando administrado por via nasal. O problema da irritação, pensa-se que está relacionada com a insolubilidade da Enviroxima na água. Com vista a solucionar este problema, veiculou-se este composto num lipossoma, levando à síntese de novas séries, entre elas análogos C2 e Vinilacetileno. No caso dos análogos C2 foi realizada a substituição do grupo 2-amino, levando a uma melhoria da actividade. No que diz respeito, à serie de Viniacetileno, todos os composto derivam do composto Enviradeno (Figura 21.B), que possui uma melhor biodisponibilidade oral e não provocou vômitos nos animais testados. Entre todos os compostos desta série, um que se destacou foi o Composto 12 (Figura 21.C), que nos testes efectuados provou eficácia oral contra *Coxsackievírus A21* em ratos (DeLong et al, 1980; Heinz et al, 1995; Levandowski et al, 1982; Miller et al, 1985; Phillpotts et al, 1983; Wyde et al, 1988).

Surgiram também alguns derivados não benzimidazólicos da Enviroxima, os quais mantinham as propriedades anti-*Rhinovírus*, no entanto não demonstraram qualquer melhoria na potência em relação aos outros análogos (De Palma et al, 2008).

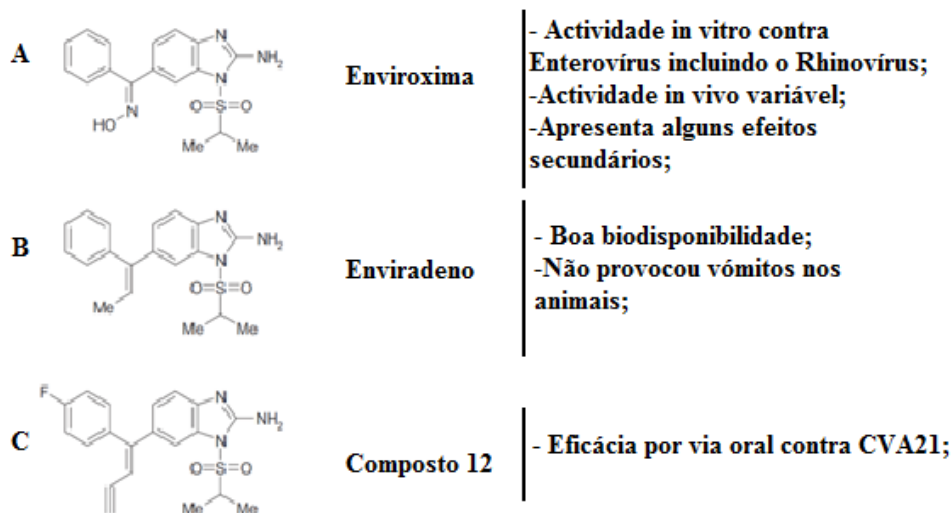


Figura 21: Enviroxima e análogos (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.6 2-FMC

Durante a preparação de um placebo realizado na Johnson & Johnson, verificou-se que o timerosal apresentava propriedades antivirais. Após esta descoberta procedeu-se à análise de outros compostos que tinham na sua composição mercúrio. De todos estes compostos, o que despertou maior interesse foi o 2-FMC (Figura 22) devido à sua actividade contra *Rhinovírus*. No estudo verificou-se que este composto era activo para o HRV-2 apresentando valores de IC₅₀ inferiores a 20 nM. Este inibe a síntese da cadeia de RNA positiva (Verheyden et al, 2004).

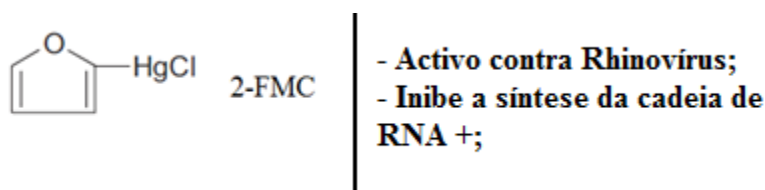


Figura 22: 2-FMC (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.7 Derivados do isotiazol

Num grupo de quatro derivados o DID (Figura 23) foi o composto que demonstrou *in vitro* uma maior actividade contra o *Poliovirus* do tipo 1. Ele actua por inibição do processo de elongação do RNA viral, através da interferência com o complexo RNA polimerase e/ou inibição da actividade da replicase (De Palma et al, 2008).

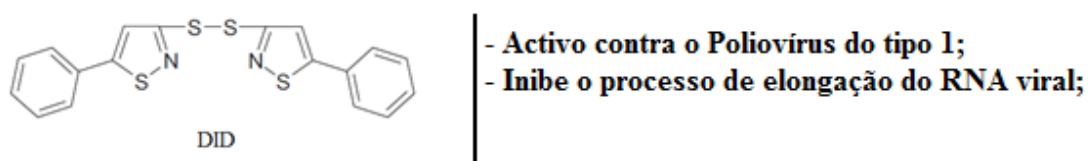


Figura 23: Derivados do Isotiozol (Adaptado de:De Palma et al, 2008).

4.2.3.8 Flavonóides

Os Flavonóides são compostos extraídos de frutas e vegetais, e são desde há muito tempo utilizados no tratamento de diversas doenças humanas já que apresentam propriedades antimicrobianas e antivirais (Cushnie et al, 2005).

Um dos primeiros compostos que demonstrou actividade antiviral foi o Ro 09-0179 (Figura 24.A), o qual é isolado de uma erva chinesa. Este é activo contra *Rhinovirus*, *Coxsackievirus* e *Poliovirus*. Ele interfere na replicação viral, mais propriamente entre a desencapsulação e o inicio da replicação viral. Num ensaio utilizando um rato infectado com *Coxsackievirus B1* foi administrado um derivado oral activo do composto Ro 09-0179, o composto Ro 09-0298 (Figura 24.B), duas vezes por dia em doses crescentes (10, 20 e 40 mg/kg) verificando-se um aumento de percentagem de sobrevivência (30, 40 e 50%). Outra série de compostos de origem natural as 3-metoxiflavonas, são isolados de extractos de uma planta. De todos estes, o composto 3-MQ provou *in vitro* ser um potente inibidor de actividade de alguns Picornavírus, entre os quais, *Poliovirus*, *Coxsackievirus* e *Rhinovirus*, com concentrações inferiores a 10 mg/ μ L. Relativamente ao mecanismo de acção do 3MQ e do Ro 09-029, ambos interferem com a síntese do RNA viral (Castrillo et al, 1987; De Palma et al, 2008; Ishitsuka et al, 1982;).

Em estudos de relação entre a estrutura e a actividade ficou provado que o grupo na posição 5 (Figura 24.A-1), o anel A polisubstituído (Figura 24.A), o 4-hidroxil (Figura 24.A-3) e o 3- metoxil (Figura 24.A-2) são indispensáveis para uma potente actividade antiviral (De Palma et al, 2008).

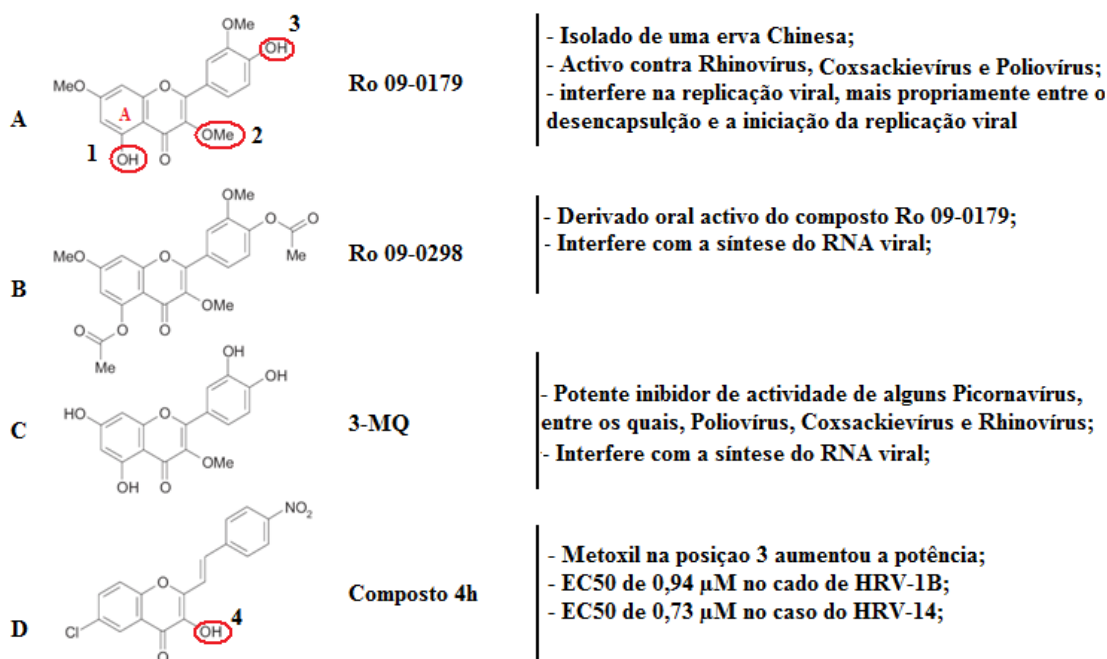


Figura 24: Flavonóides (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

No geral as flavononas são menos activas que as flavonas e a substituição na posição 3 é importante para a actividade. Sendo assim nos análogos 3-substituídos, a presença de um grupo hidroxil (Figura 24.D-4) aumenta a actividade contra *Poliovirus*, enquanto a presença de um grupo metoxil (Figura 24.A-2) beneficia a actividade contra o *Rhinovirus 1B* (Desideri et al, 2000 e 2003).

Apareceu uma nova série de vinilanálogos das flavonas, os quais apresentam actividade contra *Rhinovirus*, com valores de EC₅₀ 1,33µM no caso do HRV14. Como seria de esperar a introdução de um grupo hidroxil ou metoxil na posição 3 (Figura 24.D-4) aumentou a potência dos análogos, sendo que o composto mais potente desta série é o composto 4h (Figura 24.D) que apresenta valores de EC₅₀ de 0,94 µM no caso de HRV-1B e de 0,73 µM no caso do HRV-14 (Desideri et al, 2000 e 2003).

4.2.3.9 Gliotoxina

A Gliotoxina (Figura 25) é um metabolito fúngico que apresenta actividade antiviral. Este, é capaz de inibir a RNA polimerase do *Poliovírus*, através da ligação da ponte dissulfídica (Figura 25) ao grupo sulfidril da enzima. Ao contrário dos outros inibidores da síntese de RNA dos *Poliovírus*, como é o caso das flavonas, este inibe não só a formação da cadeia positiva como da negativa. Em estudos *in vitro* e *in vivo* que utilizaram como modelo um macaco, verificou-se que passado alguns dias após o início do tratamento o animal apresentou paralisia, o que permitiu concluir que apesar da sua eficácia este composto é altamente tóxico (Aljofan et al, 2009; Rodriguez et al, 1992; Trown et al, 1972).

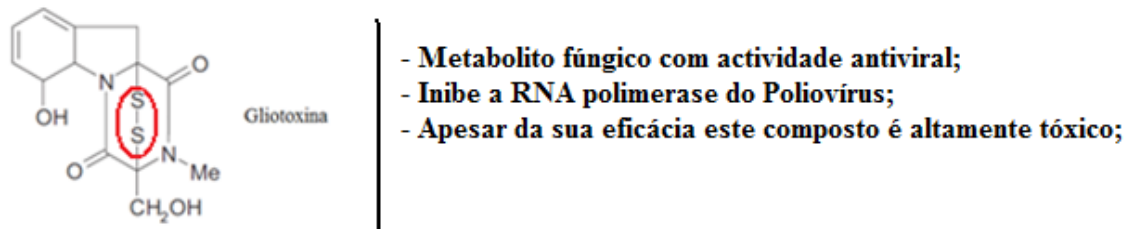


Figura 25: Gliotoxina (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.3.10 Análogos nucleosídeos

Num estudo *in vitro* no qual se pretendia estudar a eficácia de um determinado composto contra o FMDV, sintetizou-se diversos análogos, os quais demonstraram ser eficazes contra *Poliovírus* e *Coxsackievírus B3*, como é o caso do 5-nitroctidina e 5-aminocitidina. Estes actuam por inibição da RNA polimerase, e comparando com outros inibidores do *Poliovírus* o 5-nitroctidina demonstrou ser mais eficaz (De Palma et al, 2008; Harki et al, 2006).

4.2.3.11 Pirrolidina Ditiocarbamato

O PDTC (Figura 26) é um antioxidante com propriedades antivirais contra *Poliovírus*, *Coxsackievírus B3*, *Cardiovírus* e alguns *Rhinovírus*. Relativamente ao seu mecanismo de acção, este interfere com o RNA viral, a síntese proteica e com o

processo de síntese das poliproteínas. A actividade viral deve-se à fracção ditiocarbamato (Figura 26), a qual depende da entrada de iões de zinco para o interior da célula (Gaudernak et al, 2002; Krenn et al, 2005; Lanke et al, 2007).

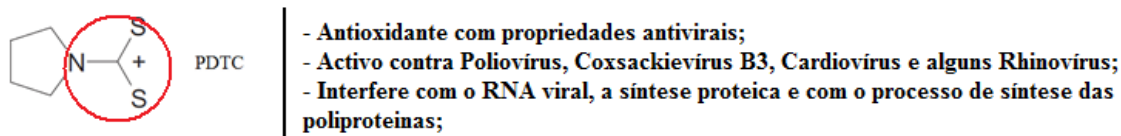


Figura 26: Pirrolidina Ditiocarbamato (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4 Inibidores de Protease

4.2.4.1 ProteaseL do FMDV

O inibidor E-64 (Figura 27) é um produto natural isolado da *Aspergillus Japonicus*. Com o objectivo de perceber o modo de acção deste composto foi realizado um ensaio *in vitro*, durante o processo de tradução. Verificou-se que o composto E-64 bloqueou a actividade autocatalitica da proteaseL do FMDV, o que teve como consequência a inibição da libertação do precursor da proteína estrutural. Relativamente aos resultados obtidos num ensaio com células infectadas, pode-se concluir que tanto o E-64 como E-64d (Figura 27) (análogo do E-64) são eficazes na redução do rendimento do vírus. Ambos não mostraram toxicidade e são bem tolerados com doses inferiores a 400mg/kg nas diferentes vias de administração (De Palma et al, 2008).

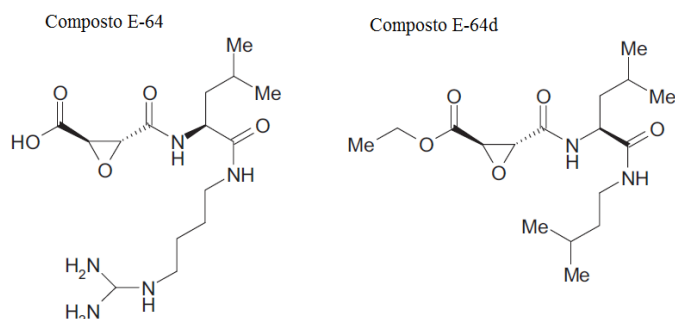


Figura 27: ProteaseL do FMDV (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.2 Inibidores da protease 2A

4.2.4.2.1 Agentes tiol-alquilantes

Com o objectivo de caracterizar a Protease 2A, König e Rosenwirth, estudaram alguns inibidores desta enzima. De todos, os que apresentaram uma maior potência foram a Iodoacetamida e N- etilmaleimida (Figura 28). Numa concentração de 10mM a capacidade inibitória da Iodoacetamida foi de 79% e N- etilmaleimida de 84% (Chen et al, 2008; De Palma et al, 2008).

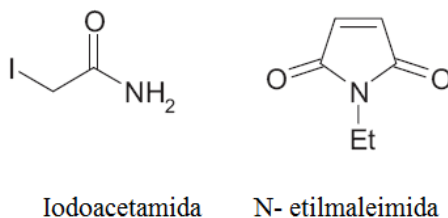


Figura 28: Agentes tiol-alquilantes (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.2.2 Inibidores clássicos específicos da elastase

Os compostos elastatinal (Figura 29) e MCPK demonstraram ser activos contra a protease 2A do HRV-14, apresentando como valores de IC_{50} 7 μ M (Elastatinal) e 65 μ M (MCPK). Foi ainda possível verificar que o MCPK provocou uma redução no rendimento do *Poliovírus* tipo 1, *Coxsackievírus A21* e *Rhinovírus 2*, em células HeLa infectadas (De Palma et al, 2008; Molla et al, 1993).

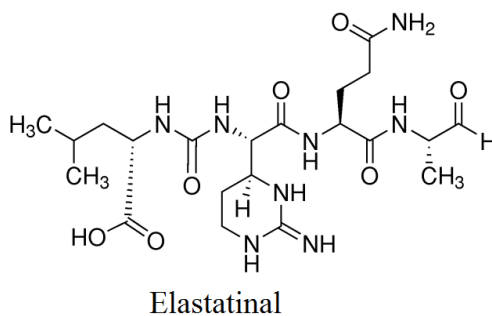


Figura 29: Elastatinal (Adaptado de: SIGMA-ALDRICH®, 2011).

4.2.4.2.3 Homoftalimidas

Inicialmente a actividade das homoftalimidas estava associada à protease 3C, no entanto mais tarde, verificou-se que estas também eram eficazes contra a protease 2A do *Rhinovírus 14*, apresentando valores de IC_{50} baixos. No caso do *Rhinovírus 2* apresenta um valor de IC_{50} na ordem dos $3,9\mu M$. Podemos concluir que esta série de compostos revela capacidade de inibir tanto protease 2A e a protease 3C (De Palma et al, 2008; Wang, 1998).

4.2.4.2.4 Compostos baseados em flúormetil cetonas

Existe no mercado uma série de derivados da flúormetil cetona (FMK), os quais são inibidores das caspases, ligam-se a um grupo Sulfidril (-SH) de um resíduo de cisteína próximo, causando inibição irreversível. Assim sendo, um grupo de cientistas quis verificar a capacidade destes compostos, nomeadamente o zVAD.fmk e zIETD.fmk contra a protease 2A do *Rhinovírus*. Quando estas se encontram na sua forma metilada, bloqueiam a quebra da eIF4GI, impedindo assim a actividade da protease 2A dos picornavírus. Relativamente às concentrações inibitórias no caso do zVAD.fmk obteve-se um IC_{50} de $5,6\mu M$, enquanto no caso do zIETD.fmk o valor da IC_{50} foi de $7,7\mu M$ (Chen, et al, 2008).

4.2.4.3 Inibidores da 3C protease

Uma série dos compostos sob o desenvolvimento por Agouron Pharmaceuticals tem como alvo a protease 3C dos picornavírus, levando à inibição da síntese viral da proteína (Patick et al, 1998).

4.2.4.3.1 Extractos Microbianos

Diversos extractos resultantes da fermentação microbiana foram reportados como inibidores da protease 3C do *Rhinovírus*. Estes compostos (Figura 30) apresentaram valores moderados de IC_{50} (De Palma et al, 2008).

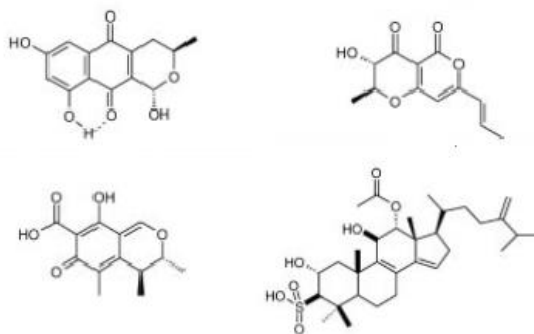


Figura 30: Extractos Microbianos (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.2 Inibidores péptidicos

Os primeiros compostos inibidores da protease foram desenvolvidos através da quebra de um péptido específico da enzima, realizando-se de seguida diversas modificações, tendo como base a estrutura 3D da protease 3C, as quais provocaram um aumento da actividade enzimática e antiviral. São constituídos no geral por vários isoésteres de glutamina no sítio P1 e contêm um grupo químico capaz de reagir com o resíduo de cisteína da enzima. Recentemente foi desenvolvida uma nova série de compostos: as isatinas, que contêm um grupo α -cetoamida, que exibe actividade contra a enzima, no entanto não demonstraram qualquer tipo de actividade antiviral em ensaios realizados com células. Outra classe que demonstrou uma potente actividade inibitória enzimática e uma actividade antiviral moderada em ensaios com células foram os análogos do aldeído tetra ou tripeptidil. A seguir, surgiu uma nova classe que continha vários aceitadores de Michael. Esta classe não só demonstrou uma potente actividade contra a enzima como também foi possível verificar uma elevada potência antiviral. No entanto notou-se uma certa instabilidade metabólica, relacionada com os aldeídos peptídicos e isto pode levar a um não desenvolvimento como droga antiviral. Realizou-se um estudo como o composto AG6084 (Figura 31), o qual demonstrou alguns atributos exclusivos de um inibidor de protease 3C. Este conseguiu inibir não só diferentes serótipos de HRV, como também inibiu o Coxsackievírus A21, Coxsackievírus B3, Enterovírus 70 e Echovírus 11 (Patick et al, 1998).

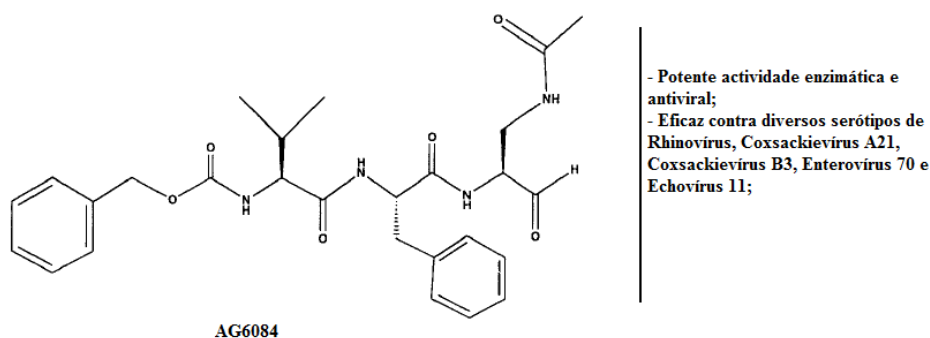


Figura 31: AG6084 (Adaptado de: Patick et al, 1998).

4.2.4.3.2.1 AG7088 (RUPINTRIVIR)

Foram realizadas algumas modificações na posição N-terminal, com o intuito de proteger o tripéptido, desenvolvendo o composto AG7088 (Figura 32). Este apresenta uma excelente actividade inibitória irreversível contra a protease 3C, potente actividade antiviral, eficaz contra um largo espectro de picornavírus e baixa toxicidade. Para além disto demonstrou ser específico contra a protease 3C dos Picornavírus sem demonstrar qualquer actividade para as proteases celulares de cisteína e serina (De Palma et al, 2008; Patick et al, 1999).

Num estudo com 23 amostras de lavados nasais, as quais foram analisadas e testadas com o composto AG7088, foi verificado uma potente actividade inibitória da protease 3C de HRV com valores de EC_{50} 24nM. Para além da actividade antiviral contra *Rhinovirus* foi verificada também actividade antiviral contra quatro estirpes de *Hepatovirus* com valores de EC_{50} 41nM. Foi demonstrado também a possibilidade deste composto inibir o CVA-21, CVB-3, EV-11 e EV-70 com valores de EC_{50} 7 a 183nM (De Palma et al, 2008).

Apesar da potente actividade antiviral demonstrada nos diversos estudos, o Rupintrivir é rapidamente hidrolisado pelo fígado, traduzindo-se numa fraca biodisponibilidade oral, por essa razão a administração por via nasal é a melhor opção. Após a análise da capacidade antiviral do composto, foram efectuados testes de segurança e farmacocinética em humanos com uma única dose e múltiplas doses por via intranasal, em ambos os casos a droga foi bem tolerada e segura. No que diz respeito aos efeitos secundários foram ligeiros e de curta duração (De Palma et al, 2008).

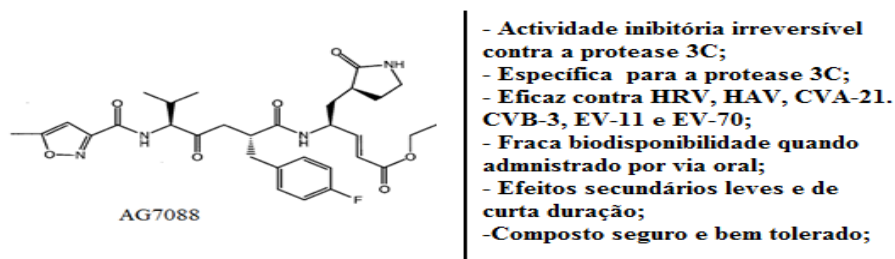


Figura 32: AG7088 (Adaptado de : Patick, et al, 1999).

4.2.4.3.2.2 Azapéptidos

Os azapéptidos inibem irreversivelmente a protease 3C por alquilação do grupo tiol com o local activo da cisteína. Foram desenhados ésteres de azapéptidos com diferentes grupos na posição P1, entre os quais surgiu o composto 19 (Figura 33.A), no entanto apresenta uma actividade moderada. Com vista à melhoria da potência inibitória foi desenvolvido o composto 16 (Figura 33.B), que é um inibidor irreversível, o qual foi desenhado tendo como base o substracto 3C do HAV e tem na sua constituição resíduos de glutamina e fenilalanina importantes para o reconhecimento por parte da enzima (De Palma et al, 2008).

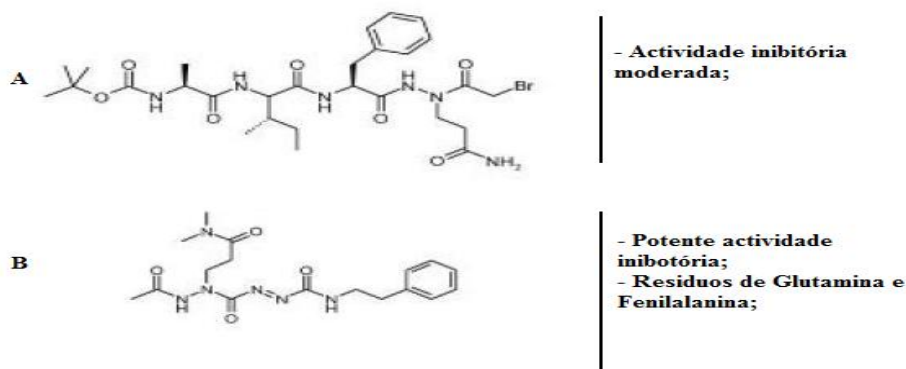


Figura 33: Azapéptidos (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.2.3 Diazometil cetonas

As diazometil cetonas foram desenvolvidas com base no local de quebra da protease 3C do HRV-14, seguindo-se uma avaliação relacionada com a sua potência. O inibidor tripeptidil-DMK Z-L-F-Q-CHN₂ (Figura 34) demonstrou uma actividade forte

contra a protease 3C do HRV-14 e HRV-16. Este actua por impedimento da maturação da poliproteína viral, notando-se uma redução da actividade da protease 3C e uma acumulação do polipeptídeo 3CD (Murray et al, 2001).

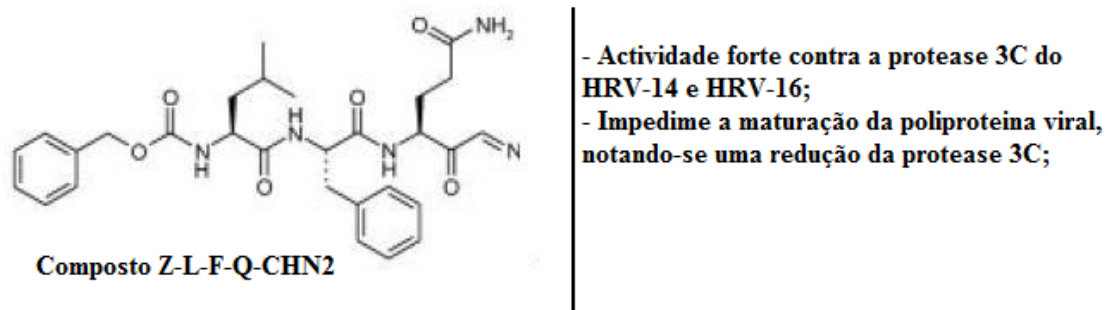


Figura 34: Inibidor tripeptidil-DMK Z-L-F-Q-CHN₂ (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.2.4 Peptidil Monofluormetilcetonas

Os aldeídos peptídicos apresentam uma boa actividade como inibidores enzimáticos, no entanto como agentes terapêuticos não apresentam qualquer tipo de eficácia devido a problemas de transporte, degradação metabólica e biodisponibilidade oral fraca. Todavia os peptidil monofluormetilcetonas demonstraram *in vivo* eficácia num variado número de sistemas. Baseando a síntese destes compostos no substrato péptidico da protease 3C do HAV, surgiu o composto 13a (Figura 35), que inactiva irreversivelmente a protease 3C do HAV, com valores de IC₅₀ na ordem dos 41µM (De Palma et al, 2008; McGrath et al, 1995).

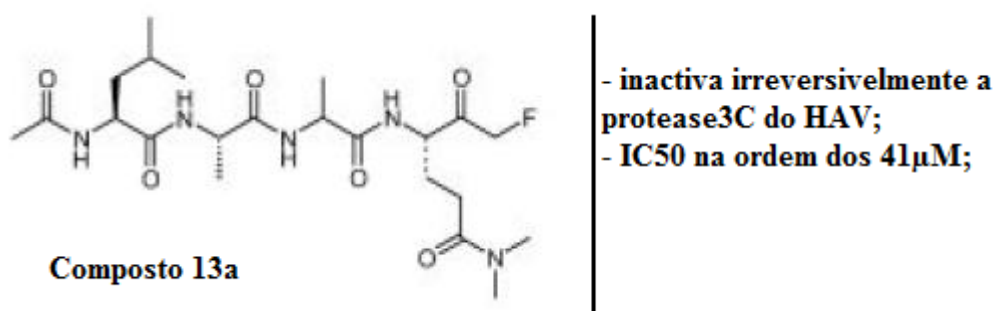


Figura 35: Composto 13a (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.2.5 Análogos Cetoglutamina

Os análogos de dimetil glutamina que contêm a função cetona na sua composição foram desenvolvidos como potenciais inibidores da protease 3C dos *Hepatovírus*. Com a introdução de um grupo α ftalhidrazida verificou-se que este inibia reversivelmente a protease 3C do HAV com um valor de IC_{50} de $89\mu M$. Para que ocorra reconhecimento enzimático foi necessário colocar um tripéptido, que não provocou alterações na actividade inibitória da 3C protease. Como exemplo destes compostos temos o Composto 24 (Figura 36), eficaz contra HAV e com valores de IC_{50} de $13\mu M$ (Ramtohul et al, 2002).

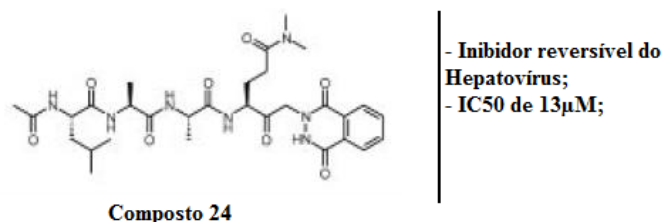


Figura 36: Composto 24 (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.2.6 S-nitrosotiol

O óxido nítrico (NO) demonstrou capacidade de inactivar enzimas que contêm cisteína, assim sendo, compostos que contenham NO exibem actividade inibitória contra a protease 3C do HRV. Dentro desta classe, foi especificamente desenhado e sintetizado o composto da Figura 37, uma vez que contêm uma sequência péptidica (Glu-Ala-Leu-Phe-Gle) semelhante ao substrato da protease 3C (Caselli et al, 1994; De Palma et al, 2008).

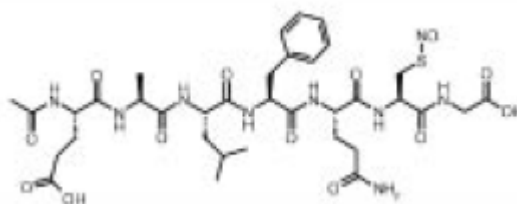


Figura 37: Derivado do S-nitrosotiol (Adaptado de: De Palma, A.M. et al, 2008).

4.2.4.3.2.7 Peptidil N-iodoacetamida

A iodoacetamida é um composto que inibe irreversivelmente a protease 3C do *Poliovírus*, *Hepatovírus* e *Rhinovírus*. O composto da Figura 38 apresenta 60 vezes mais poder inibidor irreversível do HAV do que a iodoacetamida (De Palma et al, 2008).

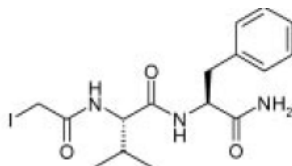


Figura 38: Derivado da iodoacetamida (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.2.8 Triptidil α -cetoamida

Esta nova classe de compostos Triptidil α -cetoamida, do qual faz parte o Composto 41 (Figura 39) demonstrou ser um potente inibidor. Este exibe uma atividade inibitória enzimática potente, bem como um elevado poder antiviral contra HRV 14 ($EC_{50} = 0,85 + 0,15\mu M$) e HRV 16 ($EC_{50} = 10\mu M$) (De Palma, A.M., et al, 2008).

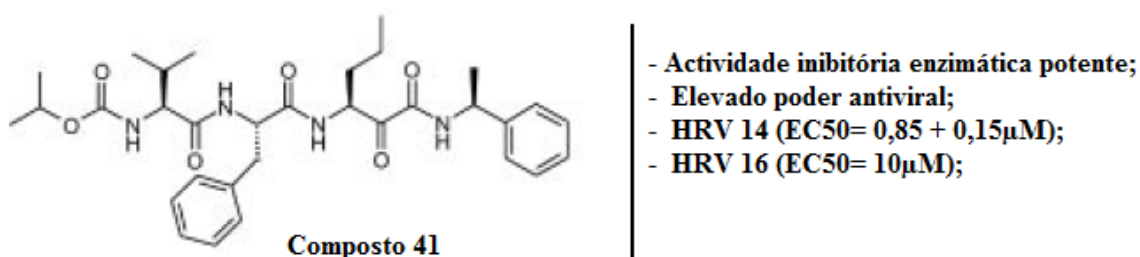


Figura 39: Composto 41 (Adaptado de: Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3 Inibidores não peptídicos

4.2.4.3.3.1 Inibidores derivados da Benzamida

Alguns investigadores desenvolveram uma nova série de compostos inibidores não-peptídicos de baixo peso molecular, tendo como base a estrutura de um aldeído péptido ligado à protease 3C. Estes compostos são activos contra *Rhinovírus*, como por exemplo o composto 22 (Figura 40.A) que é activo contra HRV-14, com valores de EC₅₀ superiores a 20µM. No entanto este apresenta uma actividade antiviral moderada quando comparado com o composto 29 (Figura 40.B) (Reich et al, 2000).

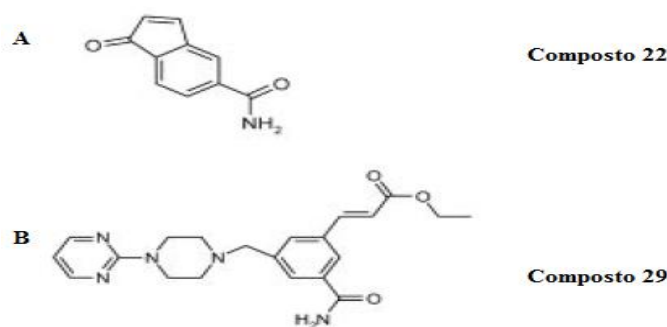


Figura 40: Inibidores derivados da Benzamida (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3.2 Isatina

A isatina, é uma classe de inibidores específicos para a protease 3C que contém um grupo α -cetoamida (Figura 41). Apesar da sua especificidade para a protease esta classe de inibidores não demonstrou qualquer tipo de actividade antiviral no entanto é bastante tóxica para as células, pensa-se que isto se deve à sua alta reactividade electrofílica (De Palma et al, 2008).

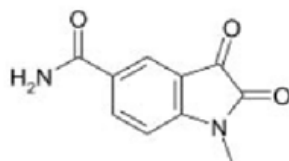


Figura 41: Composto 8 (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3.3 Spiro-Indolinone β -Lactams

Em 1990 estes compostos foram descritos pela primeira vez como possíveis inibidores da protease 3C, no entanto não são selectivos. Os dados relativos à actividade antiviral e toxicidade não se encontram descritos. Como exemplo temos o composto 7 (Figura 42), o qual inibiu a protease 3C do HRV com valores de IC_{50} de $20\mu\text{g/ml}$. (Skiles, 1990).

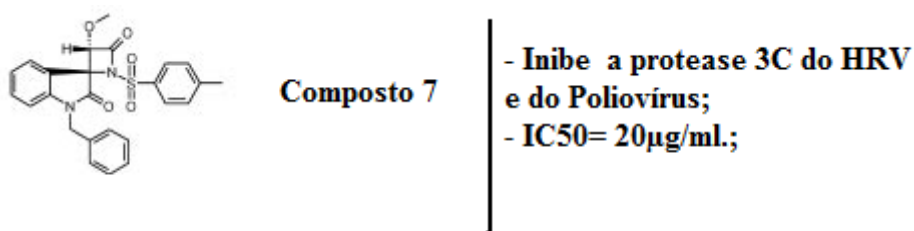


Figura 42: Composto 7 (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3.4 Homoftalimidas

As Homoftalimidas (Figura 43), nos estudos realizados apresentaram actividade contra o *Rhinovirus*, com um $IC_{50} > 100\mu\text{M}$. Os estudos feitos em cultura de células com o intuito de verificar a actividade antiviral foram concordantes com os dados de inibição da enzima (De Palma et al, 2008; Jungheim et al, 1997).

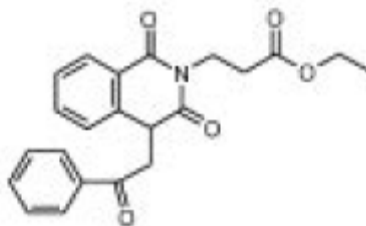


Figura 43: Homoftalimidas (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3.5 β -Lactonas

As β -Lactonas são outra classe de compostos inibidores da protease 3C contra o *Hepatovírus*. Estas ocorrem naturalmente em alguns organismos e possuem uma potente actividade biológica. Apesar de L- β -Lactonas (IC_{50} = 35 μ M) e D-N-Cbz-Serina β -Lactonas (IC_{50} = 6 μ M) (Figura 44) não apresentarem a cadeia lateral P_1 - Glutamina para o reconhecimento do substrato, ambos possuem uma elevada actividade inibitória contra a protease 3C do HAV. A sua inibição faz-se pela formação de uma ligação covalente com os grupos tiol (Lall et al, 1999).

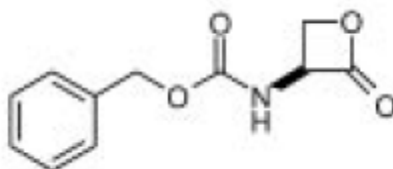


Figura 44: D-N-Cbz-Serina β -Lactonas (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3.6 Pseudoxazolonas

Devido à reactividade das Pseudoxazolonas, verificou-se que estas poderiam ser utilizadas para inibir o tiol das enzimas. O Composto 1 (Figura 45) é activo contra a protease 3C do HAV, através da formação de ligações covalentes entre o grupo imina das Pseudoxazolones e o grupo tiol da enzima. O composto inibe tanto o HAV com o HRV com valores de IC_{50} baixos (De Palma et al, 2008).

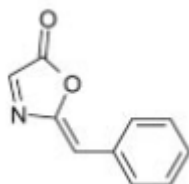


Figura 45: Composto 1 (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.4.3.3.7 Inibidores não-peptídicos de baixo peso molecular

Uma vez que alguns compostos não peptídicos apresentam alguma toxicidade e uma actividade antiviral moderada, foi desenvolvido uma nova classe, os inibidores não peptídicos de baixo peso molecular (Figura 46). A sua capacidade inibitória é comparável a um inibidor peptídico que contem chumbo, no entanto esta nova classe apresenta um aumento da actividade antiviral. Este aumento deve-se a uma melhoria das propriedades físicas, que possibilitam uma maior permeabilidade de moléculas de tamanho pequeno. É eficaz contra o HRV-14, mas a sua actividade contra outros serótipos de *Rhinovírus* caiu drasticamente (De Palma et al, 2008; Johnson, 2002).

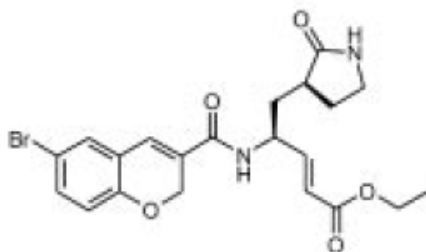


Figura 46: Inibidores não-peptídicos de baixo peso molecular (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.5 Montagem e Saída do vírus

A Hidantoína (Figura 47), demonstrou capacidade de inibir o *Poliovírus 1*, *Poliovírus 2*, *Poliovírus 3* e *Coxsackievírus A21*. Numa concentração de 25µg/mL este composto mostrou uma capacidade inibitória de 95% no caso do *PV1* e *PV2* e de 99% para o *PV3* e *CVA21*. Relativamente ao mecanismo de acção, este impede a encapsulação do RNA viral e também bloqueia a quebra da proteína pós-sintética do *Poliovírus* (Verlinden et al, 2000).

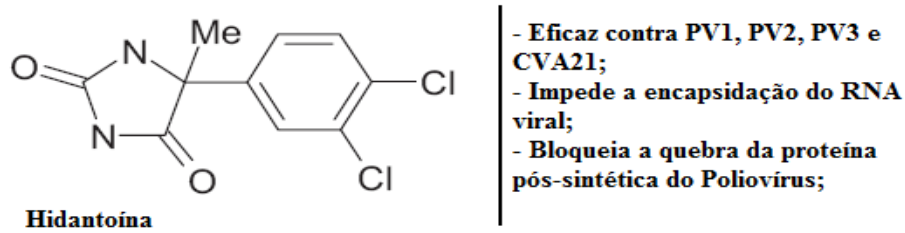


Figura 47: Hidantoína (Adaptado de: De Palma et al, 2008).

4.2.6 Interferão Nasal

Os interferões são mediadores celulares potentes e selectivos, desse modo induzem nas células do hospedeiro efeitos antivirais, antiproliferativos e imunológicos. A sua actividade anti-viral é realizada mediante um receptor específico, que em conjunto com a dupla cadeia de RNA, induz a expressão de proteínas, algumas das quais são responsáveis pela actividade antiviral (Rotbart, 2002).

O interferão α demonstrou ser um potente inibidor de picornavírus, no entanto quando ocorre sinergia com inibidores de fixação, entrada e desencapsulação análogos nucleosídicos ou interferão γ verifica-se um aumento de protecção contra infecção (Rotbart, 2002).

A eficácia do interferão nasal como tratamento profilático dos resfriados provocados pelo Rhinovírus foi estudada exaustivamente. No entanto os efeitos secundários que provoca, tais como a irritação nasal e endurecimento ou ulceração da mucosa nasal, reduziram o seu campo de aplicação (Rotbart, 2002).

V Conclusão

A família *Picornaviridae* abrange um extenso número de vírus, os quais revelam um elevado interesse clínico tanto na medicina humana como na medicina animal, causando significativa morbidade e mortalidade. O vírus causador de mais infecções durante o ano todo é o *Rhinovírus*, apesar de ser responsável por uma doença ligeira, traduz-se por ano em elevadas perdas económicas devido a abstinência escolar e laboral. Os restantes *Enterovírus*, são responsáveis por diversas infecções particularmente em crianças e recém-nascidos. A gravidade desta infecção é muito variável, sendo em alguns casos potencialmente letal. O *Poliovírus* continua a ser uma ameaça para a humanidade, mas com o aparecimento das vacinas houve um decréscimo no número de pessoas infectadas apesar de em quatro países (Afeganistão, Nigéria, Índia e Paquistão) a infecção permanecer endémica (De Palma et al, 2008, Rotbart, 2002).

Em alguns casos é complicado desenvolver eficazmente um agente antiviral. Este é o caso, dos *Enterovírus* devido à sua elevada taxa de mutação. Para ultrapassar esse problema, pode ser realizada uma terapia combinada, evitando ou atrasando o surgimento de vírus resistentes. No entanto, esta não é a única dificuldade para desenvolver drogas eficazes contra Picornavírus. Com efeito, quando se pretende desenvolver um agente antiviral para os Picornavírus é necessário respeitar alguns parâmetros adicionais: 1) A molécula deve ser activa para vários serótipos, já que diferentes serótipos podem provocar a mesma doença (ex: a meningite pode ser devido a *Coxsackievírus A e B*); 2) A droga deve apresentar biodisponibilidade sistémica já que alguns destes vírus causam infecções em múltiplos órgãos (ex: os *Enterovírus*, são responsáveis por doenças sistémicas que afectam o SNC, coração e pulmões); 3) A droga deve ter a capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica uma vez que alguns *Enterovírus* provocam meningite viral; 4) A droga deve ser absolutamente segura, uma vez que estas infecções causam desde doenças muito graves a doenças ligeiras, que resolvem espontaneamente e afectam desde recém-nascidos até idosos, incluindo também indivíduos imunodeprimidos (Chen et al, 2008).

Actualmente, ainda não existe nenhuma terapia aprovada para o tratamento específico de infecções por Picornavírus, realizando-se por isso apenas o tratamento

sintomático. Na maioria dos casos, este facto é clinicamente pouco importante, uma vez que a maior parte das infecções apresentam uma resolução espontânea. Noutros casos em que a patologia é clinicamente mais grave como no caso da infecção por Poliovírus ou pelo vírus da Hepatite A, pode recorrer-se à utilização de vacinas, as quais se revelaram eficazes na prevenção destas infecções reduzindo muito a sua ocorrência nos países que as adoptaram de modo consistente (De Palma et al, 2008).

Apesar de clinicamente pouco importantes, as infecções por Picornavírus que apresentam resolução espontânea, constituem ainda assim um grande problema de saúde publica, com um enorme impacto na economia. Assim, ao longo dos anos foram desenvolvidas diversas moléculas com o objectivo de combater estas infecções. Os compostos mais bem caracterizados são aqueles que tem como alvo a protease 2A e 3A e a proteína viral VP1 da cápside. A eficácia *in vitro* de algumas classes de agentes antivirais, tais como, inibidores da fixação, entrada e desencapsulação, inibidores da replicação e inibidores de protease, levaram à evolução de compostos promissores. No entanto, destes apenas a Imunoglobulina intravenosa se encontra aprovada e disponível para tratamento, apesar de o seu uso ser limitado e apresentar grande variabilidade de resultados devido à impossibilidade de padronização do fármaco (De Palma et al, 2008).

O primeiro composto a ser desenvolvido foi o Pleconaril. Em 1996 os Laboratorios Viropharma disponibilizaram o fármaco apenas para uso hospitalar no caso de doentes que apresentavam miocardites, meningoencefalites e sépsis neonatal. Mais tarde, em 2002, foi realizada uma tentativa de utilização do composto no caso de constipações. No entanto a aprovação do pleconaril foi recusada pela US FDA, devido à falta de segurança da droga, verificada na Fase II dos ensaios clínicos. Com efeito, verificou-se que este interferia com alguns medicamentos, incluindo os contraceptivos orais. Foram ainda observados alguns efeitos adversos tais como problemas gastrointestinais, aumento do colesterol sérico e hemorragias menstruais em mulheres a tomar contraceptivos orais. Mais tarde em 2007, o pleconaril finalizou a Fase II, que tinha como objectivo verificar a eficácia de um spray nasal com a substância, em pacientes com constipação e exacerbação da asma. Contudo ainda decorre um estudo sobre a eficácia e segurança do pleconaril em situação de sépsis neonatal, o qual começou em Junho de 2001 e finaliza em Setembro de 2012 (ClinicalTrials.gov, 2010).

Neste estudo actual em cada três bebés, dois recebem o pleconaril e um terceiro o placebo, permanecendo em vigilância hospitalar. O pleconaril actua por inibição da função de uma proteína viral da cápside, impedindo assim o ciclo de infecção. Os benefícios clínicos observados nos testes realizados em humanos juntamente com o amplo espectro de acção anti-picornavírus tornaram este agente bastante promissor. O Pirodavir demonstrou em ensaios clínicos uma baixa eficácia após administração oral, devido à sua instabilidade metabólica. No entanto foram realizadas diversas alterações, surgindo o composto BTA-798. Em 2007, a Biota concluiu com sucesso a fase I, dos ensaios clínicos deste composto, eficaz contra *Rhinovírus* entrando então na fase II dos ensaios clínicos em Agosto de 2010. O composto apresenta semelhanças com o Pleconaril, actuando ao nível da cápside e está a ser desenvolvido para a prevenção e tratamento de infecções por HRV em pacientes com risco de desenvolver uma Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica ou a Exacerbação da Asma. Pensa-se que esta molécula apresenta um futuro promissor no tratamento destas infecções. Recentes descrições sobre os inibidores da protease 3C devido ao seu amplo espectro de actividade contra vários serótipos de HRV e a sua elevada eficácia quando adicionadas ao longo do ciclo viral fazem também desta classe de compostos promissores candidatos clínicos (De Palma et al, 2008).

Apesar da quantidade de compostos desenvolvidos até à data, os quais têm como alvo preferencial o *Rhinovírus*, ainda não foi encontrada um fármaco ideal. Isto deve-se à elevada dificuldade terapêutica, uma vez que a droga deve ser capaz de aliviar e prevenir os sintomas de imediato. Desse modo muitos destes compostos vão ficando pelo caminho como é o caso da Gliotoxina e das Isatinas, que apesar de actuarem em diferentes alvos durante o ciclo viral, *in vitro* demonstraram elevada toxicidade. A Enviroxima também demonstrou uma fraca biodisponibilidade, toxicidade e efeitos secundários, como é o caso da irritação provocada pela administração por via nasal, em ensaios realizados em humanos. Contudo os seus análogos apresentam bons resultados o que os torna compostos promissores. O composto AG7088 apesar da potente actividade antiviral é rapidamente metabolizado, por essa razão o seu desenvolvimento foi interrompido. Outros compostos apresentam uma actividade moderada, o que os torna desinteressantes. Por último o interferão nasal, apesar da eficácia no tratamento, apresenta alguns efeitos secundários, tais como, irritação nasal, endurecimento ou

ulceração da mucosa nasal, o que se traduziu numa redução do seu campo de aplicação (ClinicalTrialsFeeds, 2010; De Palma et al, 2008; Gwaltney, 2002).

Em conclusão, apesar das enormes dificuldades de que se reveste o desenvolvimento de drogas específicas para o combate da infecção por picornavírus, o elevado número de drogas já desenvolvidas, e a sua eficácia *in vitro*, bem como o interessante comportamento registado por algumas nas fases iniciais dos ensaios clínicos, suporta algum optimismo para o futuro próximo. Com efeito, não será irrealista esperar que num futuro não muito distante existam no mercado compostos seguros e eficazes no tratamento de infecções por Picornavírus. Estes deverão incluir não apenas, aqueles que actualmente se encontram em fase de estudo clínico, mas também aqueles que brevemente iniciarão os ensaios clínicos.

VI Bibliografia

Alarcon, B., Zerial, A., Dupiol, C. e Carrasco, L. Antirhinovirus compound 44,081 R.P. inhibits virus uncoating. (1986). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 30(1). pp.31–34.

Aljofan, M., Sganga, M.L., K Lo, M., Rootes, K.L., Porotto, M., Adam G Meyer, A.G., Saubern, S., Anne Moscona, A. e Mungall, B.A. (2009). Antiviral activity of gliotoxin, gentian violet and brilliant green against Nipah and Hendra virus *in vitro*. *Virology Journal*. 6(1), pp. 187- 200.

al Nakib, W., Higgins, P.G., Barrow, G.I., Tyrrell, D.A., Andries, K., Vanden, B.G., Taylor, N. e Janssen, P.A. (1989). Suppression of colds in human volunteers challenged with rhinovirus by a new synthetic drug (R61837). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33 (4), pp. 522–525.

al Nakib, W., Higgins, P.G., Barrow, G.I., Tyrrell, D.A., Lenox-Smith, I. e Ishitsuka, H. (1987). Intranasal chalcone, Ro 09-0410, as prophylaxis against rhinovirus infection in human volunteers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 20(6), pp. 887–892.

Andries, K., Dewindt, B., Snoeks, J. e Willebrords, R. (1989). Lack of quantitative correlation between inhibition of replication of rhinoviruses by an antiviral drug and their stabilization. *Archives of Virology*. 106 (1), pp. 51–61.

Andries, K., Dewindt, B., Snoeks, J., Willebrords, R., van Eemeren, K, Stokbroekx, R, e Janssen, P.A. (1992), In vitro activity of pirodavir (R77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36 (1), pp.100–107.

Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, e McIntyre L, eds. (2009). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Washington DC, Public Health Foundation.

Barnard, D.L., Hubbard, V.D., Smee, D.F., Sidwell, R.W., Watson, K.G., Tucker, S.P. e Reece, P.A. (2004) In vitro activity of expanded-spectrum pyridazinyl oxime ethers related to pirodavir: Novel capsid-binding inhibitors with potent antipicornavirus activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(5), pp. 1766–1772.

Buontempo, P.J., Cox, S., Wright-Minogue, J., DeMartino, J.L., Skelton, A.M., Ferrari, E., Albin, R., Rozhon, E.J., Girijavallabhan, V., Modlin, J.F. e O’Connell, J.F. (1997). SCH 48973: A potent, broad-spectrum, antienterovirus compound. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(6), pp.1220–1225.

Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pazzagli, L., Cappugi, G. e Ramponi, G. (1994). Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *The journal of Biological chemistry*. 269(40), pp.24878–24882.

Castrillo, J.L. e Carrasco, L. (1987). Action of 3-methylquercetin on poliovirus RNA replication. *Journal of Virology*. 61(10), pp.3319–3321.

Centers for Disease Control and Prevention. (2010). [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/hfhf.htm>>. [Consultado em: 21/02/2010].

Centers for Disease Control and Prevention. (2010). [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/faq.htm>>. [Consultado em: 21/02/2010].

Chen, T.C., Weng, K.F., Chang, S.C., Lin, J.Y., Huang, P.N., e Shih, S.R. (2008). Development of antiviral agents for enteroviruses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62(6), pp. 1169-1173.

ClinicalTrialsFeeds. (2010). [Em linha]. Disponível em <<http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01175226>>. [Consultado em: 21/11/2010].

ClinicalTrialsFeeds. (2010). [Em linha]. Disponível em <<http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00031512>>. [Consultado em: 21/11/2010].

ClinicalTrialsFeeds. (2010). [Em linha]. Disponível em <<http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00394914>>. [Consultado em: 21/11/2010].

Conti, C., Tomao, P., Genovese, D., Desideri, N., Stein, ML e Orsi, N. (1992). Mechanism of action of the antirhinovirus flavanoid 40,6-dicyanoflavan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36 (1). pp.95–99.

Cox, S., Buontempo, P.J., Wright-Minogue, J., DeMartino, J.L., Skelton, A.M., Ferrari, E., Schwartz, J., Rozhon, E.J., Linn, C.C., Girijavallabhan, V. e O’Connell, J.F. (1996). Antipicornavirus activity of SCH 47802 and analogs: In vitro and in vivo studies. *Antiviral Research*. 32(2). pp.71–79.

Cushnie, T.P. e Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26(5), pp.343–356.

DeLong, D.C. e Reed, S.E. (1980). Inhibition of rhinovirus replication in organ culture by a potential antiviral drug. *The journal of infectious diseases*. 141(1), pp.87–91.

De Palma, A.M., Heggermont, W., Leyssen, P., Purstinger, G., Wimmer, E, De Clercq, E., Rao, A., Monforte, A.M., Chimirri, A. e Neyts, J.(2007). Anti-enterovirus activity and structure-activity relationship of a series of 2,6-dihalophenyl-substituted 1H,3H-thiazolo[3,4-b]imidazoles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353(3), pp. 628–632.

De Palma, A.M., Purstinger, G., Wimmer, E. Patick, A.K., Andries, K., Rombaut, B., De Clercq, E. e Neyts, J. (2008). Potential Use of Antiviral Agents in Polio Eradication. *Emerging Infectious Diseases*. 14(4), pp. 545-551.

De Palma A.M., Vliegen I., de-Clercq E., e Neyts J. (2008). Selective Inhibitors of picoARNvirus replication. *Medicinal Research Reviews*,. 28(6), pp.823-884.

Desideri, N., Conti, C., Mastromarino, P. e Mastropaolo, F. (2000). Synthesis and anti-rhinovirus activity of 2-styrylchromones. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 11(6), pp.373–381.

Desideri, N., Mastromarino, P. e Conti, C. (2003). Synthesis and evaluation of antirhinovirus activity of 3-hydroxy and 3-methoxy 2-styrylchromones. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 14(4), pp.195–203.

Drexler, J.F., Grywna, K., Stöcker, A., Almeida, P.S., Ribeiro, T.C.M., Eschbach-Bludau, M., Petersen, N., Ribeiro, H.C.Jr. e Drosten, C. (2009). Novel Human Parechovirus from Brazil. *Emerging Infectious Diseases*.15(2), pp. 310-313.

Diana, G.D., Salvador, U.J., Zalay, E.S., Johnson, R.E., Collins, J.C., Johnson, D., Hinshaw, W.B., Lorenz, R.R., Thielking, W.H., e Pancic, F. (1977). Antiviral activity of some betadiketones. 1. Aryl alkyl diketones. In vitro activity against both RNA and DNA viruses. *Journal of Medicine Chemistry*. 20(6), pp. 750–756.

Diana, G.D., Salvador, U.J., Zalay, E.S., Carabateas, P.M., Williams, G.L., Collins, J.C., e Pancic, F. (1977). Antiviral activity of some beta-diketones. 2. Aryloxy alkyl diketones. In vitro activity against both RNA and DNA viruses. *Journal of Medicine Chemistry*. 20(6), pp. 757–761.

Diana, G.D., Carabateas, P.M., Salvador, U.J., Williams, G.L., Zalay, E.S., Pancic, F., Steinberg, B.A., e Collins, J.C. (1978). Antiviral activity of some beta-diketones. 3. Aryl bis(beta-diketones). Antiherpetic activity. *Journal of Medicine Chemistry*. 21(7), pp.689 – 692.

Diana, G.D., Carabateas, P.M., Johnson, R.E., Williams, G.L., Pancic, F., e Collins, J.C. (1978). Antiviral activity of some beta-diketones. 4. Benzyl diketones. In vitro activity gainst both RNA and DNA viruses. *Journal of Medicine Chemistry*. 21(7), pp. 889–894.

Diana, G.D., McKinlay, M.A., Otto, M.J., Akullian, V., e Oglesby, C. (1985). (4,5-Dihydro-2-oxazolyl)phenoxyalkylisoxazoles. Inhibitors of picornavirus uncoating. *Journal of Medicine Chemistry*. 28(12), pp. 1906–1910.

Dutta A. (2008). Epidemiology of Poliomyelitis-Options and update. *Vaccine*. 26(45), pp.5767-5773.

Eggers, H.J. (1976). Successful treatment of enterovirus-infected mice by 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine. *The Journal of Experimental Medicine*. 143(6), pp.1367–1381.

Esfandiarei, M. e McManus, B.M. (2008). Molecular Biology and Pathogenesis of Viral Myocarditis. *Annual Reviews*. 3, pp.127–155.

Ferreira, WF. e Sousa, JC. (2002). *Microbiologia*. Lisboa. Lidel.

Florea NR, Maglio D, e Nicolau DP. (2003). Pleconaril, a novel antipicornaviral agent. *Pharmacotherapy*. 23(3), pp. 339–348.

Gwaltney, J.M. (2002). Viral Respiratory Infection Therapy: Historical Perspectives and Current Trials. *The American Journal of Medicine*. 112 (6A), pp. 338- 418.

Gaudernak, E., Seipelt, J., Triendl, A., Grassauer, A. e Kuechler, E. (2002). Antiviral effects of pyrrolidine dithiocarbamate on human rhinoviruses. *Journal of Virology*. 76(12), pp.6004–6015.

Global Polio Eradication Initiative. (2010). [Em linha]. Disponível em: <http://www.polioeradication.org/content/general/current_monthly_sitrep.asp>.

[Consultado em 11/10/2010].

Gonzalez, M.E., Almela, M.J., Yacout, M. e Carrasco, L. (1990). 6-(3,4-Dichlorophenoxy)-3-(ethylthio)-2-pyridincarbonitrile inhibits poliovirus uncoating. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 34(6). pp.1259–1261.

Hadaschik, D., Klein, M., Zimmermann, H., Eggers, H.J. e Nelsen-Salz, B. (1999). Dependence of echovirus 9 on the enterovirus RNA replication inhibitor 2-(alpha-Hydroxybenzyl)-benzimidazole maps to nonstructural protein 2C. *Journal of Virology*. 73(12), pp.10536–10539.

Harki, D.A., Graci, J.D., Galarraga, J.E., Chain, W.J., Cameron, C.E. e Peterson, B.R. (2006). Synthesis and antiviral activity of 5-substituted cytidine analogues: Identification of a potent inhibitor of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49(21), pp.6166–6169.

Hayden, F.G., Hipskind, G.J., Woerner, D.H., Eisen, G.F., Janssens, M., Janssen, P.A., e Andries, K. (1995) .Intranasal pirodavir (R77,975) treatment of rhinovirus colds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39 (2), pp.290–294.

Heinz, B.A. e Vance, L.M. (1995). The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus. *Journal of Virology*. 69(7), pp.4189–4197.

Hunt, R, 2010, Picornaviruses – Part One. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/picorna.htm> . University of South Carolina School of Medicine.

Hunt, R, 2010, Picornaviruses – Part Two. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/rhino.htm>. University of South Carolina School of Medicine.

Hunt, R, 2010, Picornaviruses – Part Three. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/polio.htm>. University of South Carolina School of Medicine.

Hunt, R, 2010, Disease Transmitted Enterically Hepatitis A And E- Part One. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-disease.htm>. University of South Carolina School of Medicine.

Ishitsuka, H., Ohsawa, C., Ohiwa, T., Umeda, I. e Suhara, Y. (1982). Antipicornavirus flavone Ro 09-0179. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22(4), pp.611–616.

Jesus,N. (2007). *Virology Journal*. *Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis* *Rewiew*,4:70. [Em linha]. Disponível em <<http://www.virologyj.com/content/4/1/70>>. [Consultado em 22/10/2009].

Johnson, T.O., Hua, Y., Luu, H.T., Brown, E.L., Chan, F., Chu, S.S., Dragovich, P.S., Eastman, B.W., Ferre, R.A., Fuhrman, S.A., Hendrickson, T.F., Maldonado F.C., Matthews, D.A., Meador, J.W., Patick, A.K., Reich, S.H., Skalitzky, D.J., Worland, S.T., Yang, M., e Zalman, L.S. (2002). Structure-based design of a parallel synthetic array directed toward the discovery of irreversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45 (10), pp. 2016–2023.

Jungheim LN, Cohen JD, Johnson RB, Villarreal EC, Wakulchick M, Loncharich RJ, e Wang QM. (1997). Inhibition of human rhinovirus 3C protease by homophalamides. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 7(12), pp. 1589–1594.

Kenny, M.T., Dulworth, J.K., Bargar, T.M., Torney, H.L., Graham, M.C. e Manelli, A.M. (1986). In vitro antiviral activity of the 6-substituted 2-(3,4-dichlorophenoxy)-2H-pyrano[2,3-b]pyridines MDL 20,610, MDL 20,646, and MDL 20,957. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 30(3), pp.516–518.

Kenny, M.T., Torney, H.L. e Dulworth, J.K.(1988). Mechanism of action of the antiviral compound MDL 20,610. *Antiviral Research*. 9(4), pp.249–261.

Kerkvliet, J., Edukulla, R. e Rodriguez, M.(2010). Novel Roles of the Picornaviral 3D Polymerase in Viral Pathogenesis. *Advances in Virology*. vol. 2010, Article ID 368068, 9 pages. doi:10.1155/2010/368068

Klein, M., Hadaschik, D., Zimmermann, H., Eggers, H.J. e Nelsen-Salz, B. (2000). The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: The significance of viral protein 2C. *Journal of General Virology*. 81(4), pp.895–901.

Krenn, B.M., Holzer, B., Gaudernak, E., Triendl, A., van Kuppeveld, F.J. e Seipelt, J.(2005). Inhibition of polyprotein processing and RNA replication of human rhinovirus by pyrrolidine dithiocarbamate involves metal ions. *Journal of Virology*. 79(22), pp.13892–13899.

Kuz'min, V.E., Artemenko, A.G., Muratov, E.N., Volineckaya, I.L., Makarov, V.A., Riabova, O.B., Wutzler, P. e Schmidtke, M. (2007). Quantitative structure-activity relationship studies of (biphenyloxy)propylisoxazole derivatives. Inhibitors of human rhinovirus 2 replication. *Journal of Medicinal Chemistry*. 50 (17), pp.4205 – 4213.

Lall, MS., Karvellas, C., e Vederas, JC. (1999). Beta-lactones as a newclass of cysteine proteinase inhibitors: Inhibition of hepatitis A virus 3C proteinase by N-Cbz-serine beta-lactone. *Organic Letters*. 1(5), pp. 803–806.

Lanke, K., Krenn, B.M., Melchers, W.J., Seipelt, J. e van Kuppeveld, F.J. (2007). PDTC inhibits picornavirus polyprotein processing and RNA replication by transporting zinc ions into cells. *Journal of General Virology*. 88 (4), pp.1206–1217.

Levandowski, R.A., Pachucki, C.T., Rubenis, M. e Jackson, G.G. (1982). Topical enviroxime against rhinovirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22(6), pp.1004–1007.

Levy, C.E. (2004). *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. Salvador, Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Mackay, I.M. (2008). Human Rhinovirus: The cold War's resume, *Journal of Clinical Virology*. 42(4), pp. 297-320.

Makarov, V.A., Riabova, O.B., Granik, V.G., Wutzler, P. e Schmidtke, M. (2005). Novel, (biphenyloxy)propylisoxazole derivatives for inhibition of human rhinovirus 2 and coxsackievirus B3 replication. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55(4), pp. 483 – 488.

Markley, L.D., Tong, Y.C., Dulworth, J.K., Steward, D.L., Goralski, C.T., Johnston, H., Wood, S.G., Vinogradoff, A.P. e Bargar TM. (1986). Antipicornavirus activity of substituted phenoxybenzenes and phenoxy pyridines. *Journal of Medicinal Chemistry*. 29(3), pp.427–433.

McGrath, M.E., Eakin, A.E., Engel, J.C., McKerrow, J.H., Craik, C.S. e Fletterick, R.J. (1995). The crystal structure of cruzain: A therapeutic target for Chagas' disease. *Journal of Molecular Biology*. 247(2), pp.251–259.

Miller, F.D., Monto, A.S., DeLong, D.C., Exelby, A., Bryan, E.R. e Srivastava, S. (1985). Controlled trial of enviroxime against natural rhinovirus infections in a community. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27(1), pp.102–106.

Moeremans, M., De Raeymaeker, M., Daneels, G., De Brabander, M., Aerts, F., Janssen, C. e Andries, K (1992). Study of the parameters of binding of R 61837 to human rhinovirus 9 and immunobiochemical evidence of capsidstabilizing activity of the compound. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36 (2), pp.417–424.

Molla A, Hellen CU, e Wimmer E. (1993). Inhibition of proteolytic activity of poliovirus and rhinovirus 2A proteinases by elastase-specific inhibitors. *Journal of Virology*. 67 (8), pp. 4688–4695.

Murray, M.A. e Babe, L.M. (1999). Inhibitory effect of dibenzofuran and dibenzosuberol derivatives on rhinovirus replication in vitro; effective prevention of viral entry by dibenzosuberone. *Antiviral Research*. 44(2), pp.123–131.

Murray, P.R., et al. (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. 9ª edição. Washington DC, ASM Press.

Murray, M.A., Janc, J.W., Venkatraman, S. e Babe, L.M. (2001). Peptidyl diazomethyl ketones inhibit the human rhinovirus 3C protease: Effect on virus yield by partial block of P3 polyprotein processing. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 12(5), pp.273–281.

New York State Department of Health. (2004). [Em linha]. Disponível em <http://www.health.state.ny.us/diseases/communicable/hand_foot_mouth/fact_sheet.htm>. [Consultado em:20/02/2010].

Patick, A. K. et al. (1999). In Vitro Antiviral Activity of AG7088, a Potent Inhibitor of Human Rhinovirus 3C Protease, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(10), pp. 2444–2450.

Patick, A.K, e Potts, K.E. (1998). Protease inhibitors as antiviral agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4), pp. 614-627;

Peltola, V., Waris, M., Österback, R., Susi, P., Hyypiä, T., e Ruuskanen, O. (2008). Clinical effects of Rhinovirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 43(4), pp. 411-414.

Pevear, D., Tull, T., Seipel, M., e Groarke, J. (1999). Activity of Pleconaril against Enteroviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(9), pp. 2109-2115.

Phillpotts, R.J., Higgins, P.G., Willman, J.S., Tyrrell, D.A. e Lenox-Smith, I. (1984). Evaluation of the antirhinovirus chalcone Ro 09-0415 given orally to volunteers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 14(4) pp.403–409.

Phillpotts, R.J., Wallace, J., Tyrrell, D.A. e Tagart, V.B. (1983). Therapeutic activity of enviroxime against rhinovirus infection in volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 23(5), pp.671–675.

Picornaviridae Study Group. (2009). [Em linha]. Disponível em: <http://www.picornastudygroup.com/> >. [Consultado em 22/10/2009].

Pincus, S.E., Diamond, D.C., Emini, E.A. e Wimmer, E. (1986). Guanidine-selected mutants of poliovirus: Mapping of point mutations to polypeptide 2C. *Journal of Virology*. 57(2), pp.638–646.

Portal da Saúde. (2008). [Em linha]. Disponível em: <<http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/informacoes+uteis/vacinacao/vacinas> >. [Consultado em 22/10/2010].

Powers, R.D., Gwaltney, J.M., Jr. e Hayden, F.G. (1982). Activity of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-5-nitrobenzotrile (MDL-860) against picornaviruses in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22(4). pp. 639–642.

Ramtohul, Y.K., James, M.N. e Vederas, J.C. (2002). Synthesis and evaluation of keto-glutamine analogues as inhibitors of hepatitis A virus 3C proteinase. *The Journal of Organic Chemistry*. 67(10), pp.3169–3178.

Reich, S.H., Johnson, T., Wallace, M.B., Kephart, S.E., Fuhrman, S.A., Worland, S.T., Matthews, D.A., Hendrickson, T.F., Chan, F., Meador, J. III, Ferre, R.A., Brown, E.L., DeLisle, D.M., Patick, A.K., Binford, S.L. e Ford, C.E. (2000). Substituted benzamide inhibitors of human rhinovirus 3C protease: Structure-based design, synthesis, and biological evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43(9), pp-1670–1683.

Roche. (2010). [Em linha]. Disponível em: <<http://www.roche.pt/hepatites/hepatitea/diagnostico.cfm>>. [Consultado em: 12/10/2010].

Rodriguez, P.L. e Carrasco, L. (1992). Gliotoxin: Inhibitor of poliovirus RNA synthesis that blocks the viral RNA polymerase 3Dpol. *Journal of Virology*. 66(4), pp.1971–1976.

Rotbart, H.A. (2002). Treatment of picornavírus infections. *Antiviral Research*. 53(2), pp.83–98.

Rosenwirth, B., Oren, D.A., Arnold, E., Kis, Z.L. e Eggers, H.J. (1995). SDZ 35-682, a new picornavirus capsid-binding agent with potent antiviral activity. *Antiviral Research*. 26(1), pp.65–82.

Rossmann, M.G., He, Y. e Kuhn, R.J. (2002). Picornavirus- receptor interactions. *Trends in Microbiology*. 10(7), pp. 324-331.

Rozhon, E., Cox, S., Buontempo, P., O'Connell, J., Slater, W., De Martino, J., Schwartz, J., Miller, G., Arnold, E. e Zhang A.(1993). SCH 38057:A picornavirus capsid-binding molecule with antiviral activity after the initial stage of viral uncoating. *Antiviral Research*. 21(1), pp.15–35.

Rueckert R. R. (1996). Picornaviridae: the viruses and their replication. *In*: Fields B. N. *et al.* (Ed.). *Virology*, third edition. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, pp. 609-654.

Salvati, A.L., De Dominicis, A., Tait, S., Canitano, A., Lahm, A. e Fiore, L. (2004). Mechanism of action at the molecular level of the antiviral drug 3(2H)-isoflavene against type 2 poliovirus. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48(6), pp.2233-2243.

Scribd. (2007). [Em linha]. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/16561222/Tecnicas-de-Laboratorio>>. [Consultado em 06/11/2010].

Semler, B.L. e Wimmer, E. (eds).(2002). *Molecular Biology of PicoARNviruses*. Washington, USA. ASM Press.

Shih, S.R., Tsai, M.C., Tseng, S.N., Won, K.F., Shia, K.S., Li, W.T., Chern, J.H., Chen, G.W., Lee, C.C., Lee, Y.C., Peng, K.C. e Chao, Y.S. (2004). Mutation in enterovirus 71

capsid protein VP1 confers resistance to the inhibitory effects of pyridyl imidazolidinone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(9), pp.3523–3529.

Shimizu, H., Agoh, M., Agoh, Y., Yoshida, H., Yoshii, K., Yoneyama, T., Hagiwara, A. e Miyamura, T. (2000). Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives. *Journal of Virology*. 74(9), pp.4146–4154.

Siegl, G. e Eggers, H.J. (1982). Failure of guanidine and 2-(alpha-hydroxybenzyl)benzimidazole to inhibit replication of hepatitis A virus in vitro. *Journal of General Virology*. 61(1), pp.111–114.

SIGMA-ALDRICH®. (2010). [Em linha]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=E0881|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC>. [Consultado em:20/11/2010].

Skiles, JW. e McNeil, D. (1990). Spiro indolinone beta-lactams, inhibitors of poliovirus and rhinovirus 3C-proteinases. *Tetrahedron Letters*. 31(50), pp. 7277–7280.

Tavakoli, N.P., et al (2008). Detection and typing enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis, *Journal of Clinical Virology*, 43, pp. 207-211.

The Global Polio Eradication Initiative. (2010). [Em linha]. Disponível em: <http://www.polioeradication.org/content/general/MonthlyGlobal_update.pdf>. [Consultado em:08/10/2010].

Tisdale, M. e Selway, J.W. (1983). Inhibition of an early stage of rhinovirus replication by dichloroflavan (BW683C). *The Journal of General Virology*. 64(4), pp.795–803.

Trown, P.W. e Bilello, J.A. (1972). Mechanism of action of gliotoxin: Elimination of activity by sulfhydryl compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2(4), pp. 261–266.

Verheyden, B., Andries, K. e Rombaut, B. (2004). Mode of action of 2-furylmercury chloride, an anti-rhinovirus compound. *Antiviral Research*. 61(6), pp.189–194.

Verlinden Y, Cuconati A, Wimmer E, e Rombaut B. (2000). The antiviral compound 5-(3,4-dichlorophenyl) methylhydantoin inhibits the post-synthetic cleavages and the assembly of poliovirus in a cell-free system. *Antiviral Research* .48(1), pp. 61–69.

Videira, A. (2001). *Engenharia Genética*. Lisboa, Lidel.

Wang QM, Johnson RB, Jungheim LN, Cohen JD, e Villarreal EC. (1998). Dual inhibition of human rhinovirus 2A and 3C proteases by homophthalimides. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42 (4), pp. 916–920.

Wyde, P.R., Six, H.R., Wilson, S.Z., Gilbert, B.E. e Knight, V. (1988). Activity against rhinoviruses, toxicity, and delivery in aerosol of enviroxime in liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32(6), pp.890–895.

Wilson, W. e Sande, M., (2001). *Current Diagnosis & Treatment in Infectious Diseases*. Nova Iorque. McGraw-Hill Companies.

Wrong Diagnosis. (2011). [Em linha]. Disponível em: <http://www.wrongdiagnosis.com/v/viral_gastroenteritis/intro.htm>. [Consultado em:08/12/2010].