

NOÇÕES DE VIROLOGIA

META

Introduzir os conceitos básicos de Virologia, essenciais na compreensão de mecanismos biológicos realizados pelos vírus.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá

entender a classificação dos vírus

definir os critérios dos sistemas de classificação dos vírus

entender a importância da Virologia na atualidade

relacionar a questão do tamanho dos vírus e dos demais microrganismos

conceber a atuação dos vírus nos ecossistemas

entender a importância dos estudos com vírus bacteriófagos

escrever as principais características dos vírus

conceber os principais vírus agentes causadores de doenças

conceber as aplicações do conhecimento da Virologia para outras ciências

PRÉ-REQUISITOS

Para acompanhar melhor esta aula você deverá rever temas como a origem da vida, metabolismo microbiano, estruturas básicas das células eucariotas e procariotas.



Vírus HIV atacando leucócito. O vírus HIV (em vermelho) ataca preferencialmente o leucócito (branco) denominado por linfócito T auxiliar. O vírus penetra nesta célula e a destrói. O linfócito T auxiliar tem a função de coordenar a função de defesa imunológica contra vírus, bactérias e fungos. A sua destruição pelo vírus HIV dá início à deficiência imunológica. Microscopia de varredura: aumento de 20.000 vezes.

(Fontes: <http://www.ciencianews.com.br/>)

INTRODUÇÃO

Os vírus são partículas infecciosas muito pequenas para serem observados sob um microscópio óptico e seu cultivo exige um hospedeiro vivo. Portanto, embora as doenças virais não sejam novas, a identificação dos vírus como seus agentes só foi possível no século XX. Em 1886 o químico holandês Adolf Mayer demonstrou a transmissibilidade da doença do mosaico do tabaco entre plantas porém não conseguiu cultivar o agente infeccioso. Finalmente o bacteriologista russo Dmitri Iwanowski filtrou a seiva de plantas doentes com um filtro de porcelana construído para reter bactérias. Ele esperava encontrar o micróbio preso no filtro. Descobriu, ao contrário, que o agente infeccioso havia passado através dos diminutos poros do filtro. Quando ele infectou o fluido filtrado em plantas saudáveis, elas contraíram a doença. Esse fato levou a uma série de experimentos conduzidos por outros cientistas para isolar os agentes filtráveis da doença. A primeira doença humana associada com um agente filtrável foi a febre amarela.

Como os primeiros pesquisadores não podiam imaginar partículas tão pequenas, descreveram o agente infeccioso como um “fluido contagioso”. Na década de 30, os cientistas já haviam começado a usar o termo vírus, (palavra em latim para veneno), para descrever esses agentes filtráveis. A natureza dos vírus, contudo, permaneceu uma incógnita até 1935, quando o químico norte-americano Wendell Stanley isolou o vírus do mosaico do tabaco tornando possível, pela primeira vez, o desenvolvimento de estudos químicos e estruturais com um vírus purificado. Na mesma época, a invenção do microscópio eletrônico possibilitou pela primeira vez a visualização dos vírus. Sabemos, hoje, que os vírus são encontrados infectando todos os tipos de organismos vivos e, embora necessitem se manter e replicar dentro das células do hospedeiro, nem todos causam doenças. Em 1997, pesquisadores japoneses descobriram um vírus simbiote (inofensivo) em humanos que foi chamado de vírus TT (TTV), que são as iniciais do paciente de quem o vírus foi isolado pela primeira vez.

Os avanços nas técnicas de biologia molecular, e de bioinformática nos anos 80 e 90, permitiram a identificação e caracterização de diversos vírus humanos, animais e vegetais. O vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite C, os Hantavírus e o vírus do Oeste do Nilo são alguns exemplos.

Diversos aspectos dos vírus serão apresentados a seguir. Leia o texto com atenção e resolva as questões apresentadas. Boa sorte.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VÍRUS

Os vírus não são considerados organismos vivos porque são inertes fora das células hospedeiras. No entanto, quando penetram em uma célula hospedeira, seu ácido nucléico dá início a expressão de genes celulares e virais, ocorrendo a replicação viral. Sob esse ponto de vista, os vírus estão vivos quando replicam dentro da célula hospedeira infectada. Do ponto de vista clínico, os vírus podem ser considerados vivos, pois causam infecção e doença, da mesma forma que outros agentes infecciosos como bactérias, fungos e protozoários. Dependendo do ponto de vista, um vírus pode ser considerado um agente infeccioso de natureza química excepcionalmente complexa ou, um microrganismo vivo excepcionalmente simples. Composto apenas de estruturas básicas e o ácido nucléico.

Como, então definimos um vírus? Os vírus foram, originalmente, diferenciados de outros agentes infecciosos por serem extremamente pequenos (filtráveis) e, por serem parasitas intracelulares obrigatórios - ou seja, necessitam de células vivas hospedeiras para a sua multiplicação. Contudo, essas duas propriedades são compartilhadas por determinadas bactérias pequenas como algumas riquetsias. Os vírus e as bactérias são comparados por características como sua organização estrutural simples e seu mecanismo de multiplicação. Dessa forma, os vírus são entidades que:

Possuem um único tipo de ácido nucléico, DNA ou RNA;

Possuem uma cobertura protéica (às vezes recoberta por um envelope de lipídeos, proteínas e carboidratos) envolvendo o ácido nucléico;

Replica-se dentro de células vivas usando o metabolismo de síntese das células para produzirem novos vírus;

Induzem a síntese de estruturas especializadas capazes de transferir o ácido nucléico viral para outras células.

Os vírus possuem poucas enzimas próprias ou mesmo nenhuma para seu possível metabolismo. Por exemplo, não possuem enzimas para a síntese protéica e para a geração de energia (ATP). Os vírus devem-se apossar do metabolismo da célula hospedeira para a sua replicação. Esse fato tem uma grande significância clínica para o desenvolvimento de diagnóstico, vacinas, e o desenvolvimento de drogas antivirais, porque a maioria das drogas que interfere na replicação viral pode interferir também no metabolismo da célula hospedeira sendo, dessa forma, tóxicas.

TAMANHO DOS VÍRUS

Os tamanhos dos vírus variam consideravelmente de 20 a 1.000 nm e é determinado por comparação com partículas de látex de tamanho conhecido com o auxílio do microscópio eletrônico. Apesar de a maioria ser menor

que as bactérias, alguns dos maiores vírus (como o vírus da vaccínia) são praticamente do mesmo tamanho de algumas bactérias muito pequenas (como os micoplasmas, as riquetsias e as clamídias).

ESPECTRO DE HOSPEDEIROS

O espectro de hospedeiros de um vírus consiste na variedade de células hospedeiras que o vírus pode infectar. Podemos utilizar o termo tropismo viral para identificar as células alvo principais, como por exemplo: hepatotropismo; afinidade pelas células hepáticas; neurotropismo, afinidade pelas células do cérebro; epiteliotropismo, afinidade pelas células do epitélio e etc. Existem vírus que infectam invertebrados, vertebrados, plantas, protistas, fungos e bactérias. Contudo, a maioria dos vírus infecta tipos específicos de hospedeiros e células. Ocasionalmente os vírus podem infectar outros hospedeiros de baixo tropismo.

Os vírus que infectam bactérias são chamados de bacteriófagos ou fagos. Este assunto será tratado ao longo deste capítulo.

O espectro de hospedeiros de um vírus é determinado pela exigência viral quanto à sua ligação específica à célula hospedeira, pela disponibilidade de fatores celulares do hospedeiro em potencial necessários para a replicação viral e fatores externos ou ambientais. A superfície externa do vírus (aceptores) deve interagir quimicamente com receptores específicos na superfície da célula, para que ocorra a penetração do vírus. Os dois componentes complementares são unidos por ligações fracas. Para alguns bacteriófagos, o receptor faz parte da parede celular do hospedeiro; em outros casos, faz parte do pílum, fímbrias ou dos flagelos. No caso dos vírus de humanos e de animais, os receptores estão na membrana plasmática da célula hospedeira (marcadores celulares).

A possibilidade de se usar vírus em tratamentos diagnóstico e vacinas é intrigante, devido a seu espectro restrito de hospedeiros e sua capacidade de matar as células alvo. Tais idéias já existem há cerca de 75 anos. Infelizmente, maiores estudos devem ser realizados para obtenção de sistemas confiáveis que possam ser utilizados nas rotinas clínicas

ESTRUTURA VIRAL

A partícula viral completa, totalmente formada e infecciosa é composta por um ácido nucléico envolto por uma cobertura protéica que o protege do meio ambiente e serve como veículo na transmissão de uma célula hospedeira para outra. Os vírus podem ser classificados de acordo com as diferenças na estrutura desses envoltórios.

ÁCIDO NUCLÉICO

Os vírus podem possuir tanto o ácido nucléico DNA como RNA, mas nunca ambos. Podemos encontrar em células infectadas um possível ácido nucléico (DNA ou RNA) genômico e os RNAs virais expressos pela célula. O ácido nucléico dos vírus pode ser de simples fita ou dupla fita. Assim, existem vírus com DNA de dupla fita, DNA de simples fita, RNA de dupla fita e RNA de simples fita. Dependendo do vírus, o ácido nucléico pode ser linear ou circular. Em alguns vírus (por exemplo, o vírus da gripe), o ácido nucléico é segmentado. O RNA viral pode ser ainda no sentido positivo ou seja funciona diretamente como mensageiro, sendo assim infeccioso.

As porcentagens de ácido nucléico em relação à proteína podem variar de 1 %, no caso do Influenzavirus e de 50% em determinados bacteriófagos. A quantidade total de ácido nucléico varia de poucos milhares de nucleotídeos (ou pares) até 250 Kb (O cromossomo de *E. coli* possui aproximadamente 4 milhões de pares de nucleotídeos).

CAPSÍDEO E ENVELOPE

O ácido nucléico dos vírus é envolvido por uma cobertura protéica chamada de capsídeo. A estrutura do capsídeo é determinada basicamente pelo genoma viral e constitui a maior parte viral, especialmente nos vírus pequenos. O capsídeo é formado por subunidades protéicas chamadas de capsômeros. O capsídeo viral é composto por capsômeros que quase sempre formam um icosaedro. Em alguns vírus, as proteínas que compõem os capsômeros são de um único tipo; em outros, podem estar presentes vários tipos de proteínas (pentâmeras e ou hexâmeras). Os capsômeros são visíveis muitas vezes nas micrografias eletrônicas, servindo de referência morfológica e taxonômica. A organização dos capsômeros é característica para cada tipo de vírus.

Em alguns vírus, o capsídeo é coberto por um envelope que, normalmente consiste de uma combinação de lipídeos, proteínas e carboidratos. Alguns vírus animais são liberados da célula hospedeira por um processo de extrusão, em que a partícula é envolvida por uma camada de membrana plasmática celular que vai constituir o envelope viral. Em muitos casos, o envelope contém proteínas (espículas) codificadas pelo genoma do vírus juntamente com materiais derivados de componentes normais da célula hospedeira.

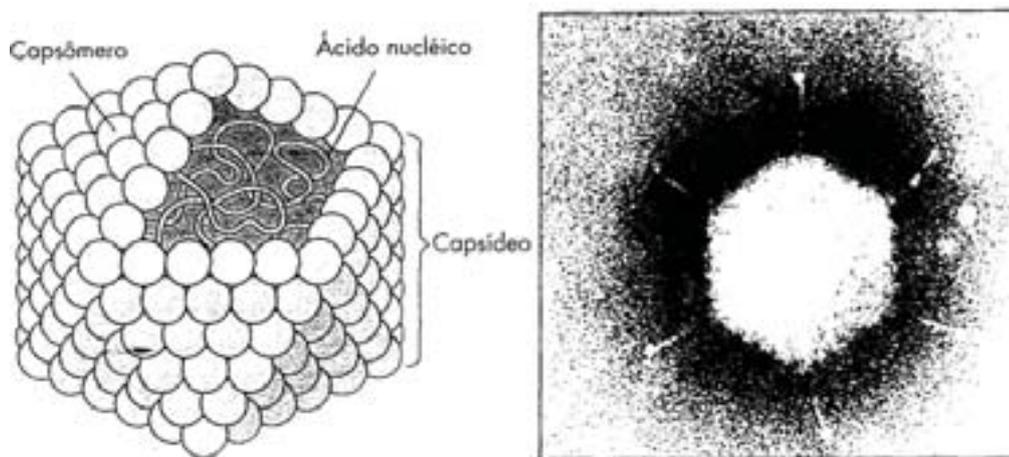
Dependendo do vírus, os envelopes podem ou não apresentar espículas, que são complexos de carboidrato-proteína que se projetam da superfície do envelope. Muitos vírus usam as espículas para ancorar na célula hospedeira. As espículas são tão características de muitos vírus que são usadas na sua identificação. A capacidade de determinados vírus, como o Influenzavirus, em agregar eritrócitos, está associada à presença das espículas. Esses vírus

ligam-se aos eritrócitos formando pontes entre eles. A agregação resultante é chamada de hemaglutinação e é a base para diversos testes laboratoriais de identificação. A composição da estrutura das espículas pode ser alterada devido a mutações em genes virais específicos. Tais alterações são bastante importantes para o vírus escapar dos mecanismos de defesa (anticorpos) do hospedeiro. Tais anticorpos são produzidos especialmente para se ligar as espículas e inativa os vírus.

Os vírus cujas cápsides não estão cobertas por um envelope são conhecidos como vírus não-envelopados. Nesse caso, é o capsídeo que protege o genoma viral do ataque pelas enzimas nucleases nos líquidos biológicos e promove a aderência da partícula às células hospedeiras susceptíveis.

MORFOLOGIA GERAL

Os vírus podem ser classificados em vários tipos morfológicos diferentes, com base na arquitetura do capsídeo. A estrutura do capsídeo tem sido elucidada por meio da microscopia eletrônica e de uma técnica chamada de cristalografia de raios X. Os vírus podem ser helicoidais, poliédricos, envelopados, complexos.

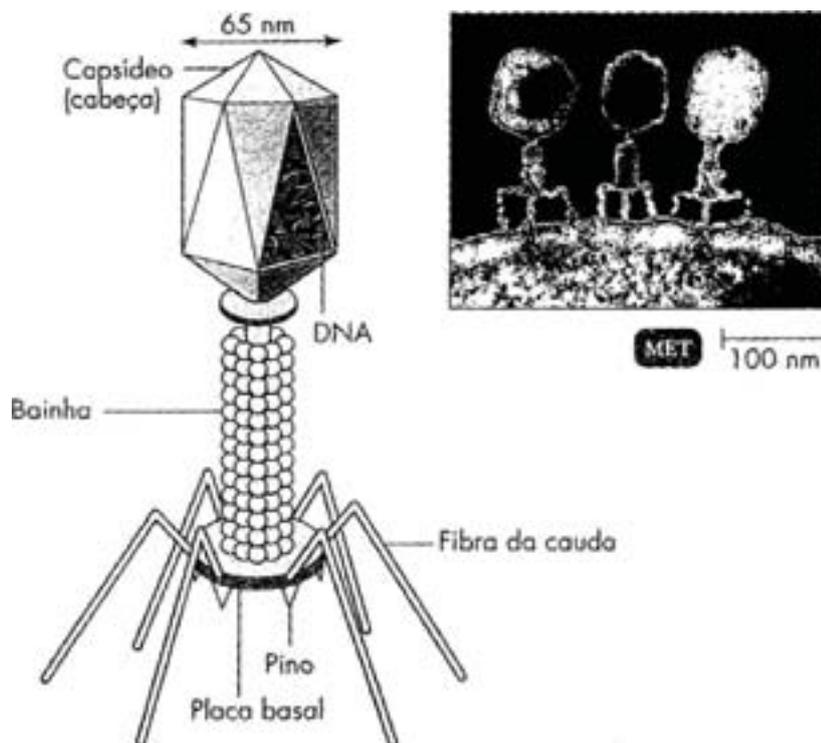


Os vírus helicoidais lembram longos bastonetes, que podem ser rígidos ou flexíveis. O genoma viral está no interior de um capsídeo cilíndrico oco com estrutura helicoidal.

Muitos vírus animais, vegetais e bacterianos são poliédricos. O capsídeo da maioria deles tem a forma de um icosaedro, um poliedro regular com 20 faces triangulares e 12 vértices. Os capsômeros de cada face formam um triângulo equilátero.

Como mencionado anteriormente, o capsídeo de alguns vírus é coberto por um envelope. Os vírus envelopados são grosseiramente esféricos.

Alguns vírus, especialmente os vírus bacterianos, possuem estruturas mistas de helicoidal e poliédrico: são denominados vírus complexos.



TAXONOMIA DOS VÍRUS

A taxonomia dos vírus é bastante complexa devido às particularidades das partículas virais e a difícil identificação de características de similaridade. Existe desde 1966 um comitê internacional de taxonomia de vírus (CITV) que periodicamente trabalha na inclusão e agrupamento dos vírus. Quando novas técnicas de caracterização de vírus são desenvolvidas e estabelecidas na comunidade científica, novos grupamentos podem surgir. A classificação mais antiga dos vírus é baseada na sintomatologia. Esse sistema não é aceitável cientificamente, porque o mesmo vírus pode causar mais do que uma doença. Além disso, esse sistema agrupa artificialmente vírus que não infectam seres humanos.

Os virologistas atualmente têm agrupado os vírus em famílias baseado: (1) no tipo de ácido nucléico, (2) no modo de replicação e (3) na morfologia. O sufixo-vírus é usado para os gêneros enquanto as famílias recebem o sufixo-viridae; a nomenclatura das ordens termina em --ales. No uso formal, os nomes das famílias e dos gêneros são utilizados da seguinte maneira: Família Herpesviridae, gênero Simplexvirus, vírus do herpes humano tipo 2.

Uma espécie viral compreende um grupo de vírus que compartilham a mesma informação genética e o mesmo nicho ecológico (espectro de hospedeiros). Epítomos específicos não são usados. Dessa forma, as espécies virais são designadas por nomes descritivos vulgares, por exemplo,

vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, as subespécies (se existirem), são designadas com um número (HIV-1).

Principais famílias de vírus patogênicos

Podemos destacar como as principais famílias de vírus patogênicos para o homem as seguintes:

- Família Parvoviridae gênero Parvovírus humano;
- Família Adenoviridae gênero Mastadenovirus;
- Família Papovaviridae gênero Papillomavirus;
- Família Poxviridae gênero Orthopoxivirus;
- Família Herpesviridae gêneros Simplexvirus, Varicelovirus, Lymphocryptovirus, Cytomegalovirus, Roseolovirus, Sarcoma de Kaposi;
- Família Hepadnaviridae gênero Hepadnavirus;
- Família Picornaviridae gênero Enterovírus, Rhinovirus;
- Família Caliciliridae gênero Vírus da Hepatite E;
- Família Togaviridae gênero Alfavirus Rubilivirus;
- Família Flaviviridae gênero Flavivirus, Pestivirus, vírus da hepatite C;
- Família Coronaviridae gênero Coronavirus;
- Família Rabdoviridae gênero Vesiculovirus, Lyssavirus;
- Família Filoviridae gênero Filavirus;
- Família Paramixoviridae gênero Paramixovirus, Morbilivirus
- Família Deltaviridae gênero Hepatite D;
- Família Orthomixoviridae gênero Influenzavirus;
- Família Bunyaviridae gênero Bunyavirus, Hantavirus;
- Família Arenaviridae gênero Arenavirus;
- Família Retroviridae gênero Oncovirus, lentivirus;
- Família Reoviridae gênero Reovirus, Rotavirus.

CULTIVO DE VÍRUS BACTERIÓFAGOS EM LABORATÓRIO

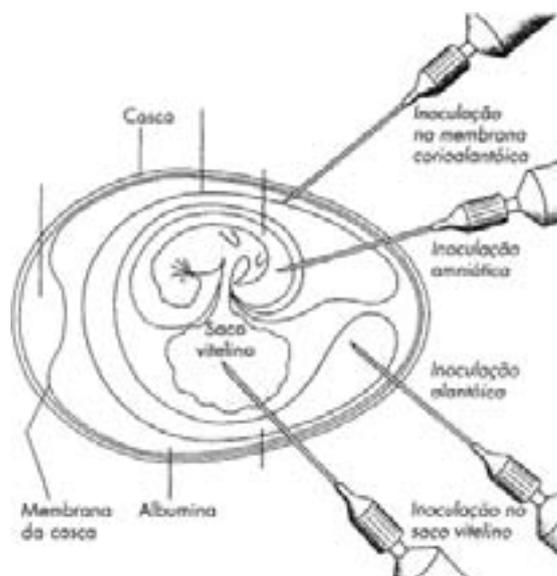
Os bacteriófagos podem replicar tanto em culturas bacterianas em meio líquido em suspensão ou, em meio semi-sólido. O meio semi-sólido torna possível o uso do método da placa de lise para a detecção e contagem das partículas virais. Mistura-se uma amostra de bacteriófagos com as bactérias em agar fundido. A mistura é, então, colocada em uma placa de Petri contendo uma camada de meio de cultivo com agar solidificado. A mistura vírus-bactéria se solidifica, formando uma camada com a espessura aproximada de uma célula bacteriana. Todos os vírus infectam uma bactéria, multiplica-se e libera várias centenas de novos vírus que infectarão as bactérias vizinhas que, por sua vez, produzirão novos vírus. Depois de vários ciclos de replicação viral, são destruídas todas as bactérias nas proximidades do vírus original. Isso produz um determinado número de zonas claras ou

placas de lise, visíveis contra uma camada de bactérias que se desenvolvem na superfície do agar. Enquanto as placas de lise se formam, as bactérias não-infectadas, em outras regiões da cultura, continuam proliferando e produzem um fundo turbido.

Cada placa de lise corresponde, teoricamente, a uma única partícula viral da suspensão original. Logo, a concentração das suspensões virais, medida pelo número de placas de lise formadas, é, geralmente, dada em unidades formadoras de placas (UFP).

CULTIVO DE VÍRUS ANIMAIS

O cultivo de um determinado vírus animal é limitado pela necessidade de um tecido vivo em que as células possuam receptores apropriados, e que sejam suscetíveis à replicação dos vírus após a penetração no citoplasma. Inicialmente dispunha-se apenas de animais de experimentação em que se conseguia obter a multiplicação dos vírus, como o vírus da Raiva em coelhos. Hoje em dia essa prática persiste, sendo um exemplo importante a vigilância de arboviroses (de “artropod-born” ou veiculado por artrópodes, como os vírus da dengue e febre amarela, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*). Nesse procedimento hemolinfa de mosquitos ou sangue de animais silvestres são inoculados em cérebro de camundongos neonatos, observando-se ocorre o aparecimento de sintomas de paralisia quando há presença de um arbovírus. Uma alternativa é a inoculação desses fluidos nas cavidades (ex.: alantóide) de ovos embrionados, cujo epitélio ou eventualmente o próprio tecido embrionário seja suscetível à infecção por determinados vírus (por exemplo, os vírus do Sarampo, Influenza, Pólio e Herpes crescem bem nessas condições).



O estudo dos vírus animais teve um grande avanço a partir dos anos 40, quando se começou a utilizar as culturas celulares, desenvolvido inicialmente por Enders e colaboradores, para a multiplicação *in vitro* do vírus da poliomielite.

As células podem ser obtidas a partir de culturas de explante. Essa técnica consiste na utilização de fragmentos de tecidos ou órgãos, que são cultivados em meio adequado de crescimento celular. Os fragmentos aderidos à superfície de um frasco apropriado vão liberar espontaneamente as células, de maneira a formar uma camada monocelular. Essas culturas de células em monocamada podem também ser preparadas pelo tratamento do tecido original, ou da linhagem estabelecida já cultivada em frascos, com agentes dispersantes tais como: enzimas proteolíticas (ex.: tripsina) e/ou substâncias quelantes (ex.: EDTA). Assim, com a retirada das proteínas, do cálcio e do magnésio, necessários para a ligação na estrutura do tecido ou à superfície de cultivo (plástico ou vidro), as células são dispersas. Isso é feito em meio nutritivo, sendo que após algumas horas de incubação as células aderem-se à superfície do novo frasco, e multiplicam-se formando outra camada celular. A esse procedimento é dado o nome de sub-cultivo, passagem ou repique.

As culturas primárias são derivadas diretamente dos tecidos. Esse tipo de cultura celular é constituído por células diplóides (contém o mesmo número de cromossomos da espécie que deu origem à cultura). A cultura primária é geralmente mais sensível que as demais para o cultivo de vírus, e pode ser utilizada para a produção de vacinas. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, entre elas, a maior dificuldade de obtenção, o alto custo e a possibilidade de contaminação por vírus latentes. As culturas primárias quando sub-cultivadas, em geral, degeneram e morrem após a segunda ou terceira passagem.

No decorrer de sub-cultivos das culturas primárias, pode haver a seleção de clones, capazes de sobreviver e se multiplicar por 50 ou mais passagens. Esses clones dão origem às chamadas linhagens celulares, também denominadas de linhagens estabelecidas ou contínuas, que podem ser aneuplóides (com número de cromossomos alterado). São sensíveis para o isolamento de vírus e são de manutenção relativamente fácil. Os estoques devem ser congelados em baixo número de passagens, e reativados quando necessário, mantendo assim a mesma sensibilidade à infecção. Quando a cultura de espante é feita a partir de tecido tumoral, em geral as linhagens celulares são obtidas mais rapidamente e são aneuplóides. Estas podem ser úteis para fins de diagnóstico, isolamento e propagação de vírus, produção de reagentes, mas não para produção de vacinas.

Outro método, utilizado para a obtenção de culturas celulares, baseia-se no cultivo de células em suspensão, obtidas de tecido originalmente não aderente ou adaptadas a essa condição. Neste caso, grandes populações de células podem ser obtidas, sendo úteis para o preparo de grandes volumes

de vírus com altos títulos, como na produção de antígenos para confecção de vacinas ou reagentes para diagnóstico.

IDENTIFICAÇÃO VIRAL

A identificação de um isolado viral não é uma tarefa fácil. Para começar, os vírus só podem ser visualizados por meio do uso do microscópio eletrônico. Os métodos sorológicos, como o ELISA e o Western blotting, são os métodos de identificação mais comumente usados. Nesses testes o vírus é detectado e identificado por sua reação com anticorpos.

A observação dos efeitos citopáticos dos vírus nas células hospedeiras, também é útil na identificação dos vírus.

Os virologistas usam os métodos moleculares modernos como as análises do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) na identificação e na caracterização dos vírus. A RT-PCR é utilizada para a identificação de vírus RNA.

ISOLAMENTO VIRAL A PARTIR DE MATERIAL CLÍNICO

Como vimos acima, os sistemas celulares mais utilizados para o isolamento dos vírus são: as culturas de células *in vitro*, os ovos embrionados de galinha e os animais de laboratório. A grande variedade de métodos e sistemas utilizados no isolamento de vírus de amostras de material clínico reflete, de fato, que as condições ótimas de isolamento são distintas para cada vírus. Se um hospedeiro insensível é inoculado com uma amostra contendo determinado vírus, este provavelmente não será isolado, e um resultado falso negativo será obtido. As culturas celulares apresentam grande variação na sua suscetibilidade aos diferentes vírus, por exemplo: para o isolamento de poliovírus as culturas mais indicadas são as culturas primárias de rim de macaco ou as linhagens celulares de rim de macaco (GMK - rim de macaco verde ou LLC-MK2 - rim de Macaca mulata) ou ainda linhagens celulares humanas (RD - rhabdomyosarcoma humano). Para adenovírus a linhagem mais indicada é a HEp-2 (carcinoma epitelial humano); para o vírus do sarampo e o vírus Herpes, a linhagem celular mais indicada é a VERO (rim de macaco verde). Quando pequenas quantidades de vírus estão presentes numa amostra, um resultado positivo só pode ser obtido quando o sistema mais sensível é utilizado. Portanto, é muito importante que o laboratório seja informado da síndrome clínica, ou do vírus suspeito, para que se possa utilizar o melhor método de detecção. Nenhuma técnica laboratorial (ou cultura celular), no entanto, será eficiente, se a amostra não for colhida, transportada, armazenada e processada de forma adequada. As amostras precisam ser colhidas na fase aguda da infecção e sua escolha

deve ser apropriada: fezes, para vírus entéricos; secreção nasal para vírus respiratórios; sangue, para vírus de transmissão sangüínea, etc. As amostras, quando colhidas com "swab" (tipo de cotonete), devem ser imediatamente colocadas em solução salina tamponada ou meio de cultura, para evitar que ressequem com a conseqüente desnaturaçã dos vírus. De forma geral, todas as amostras devem ser transportadas em temperatura de geladeira para o laboratório imediatamente, e assim conservado até o momento do diagnóstico, para evitar a inativação dos vírus pelo calor. As amostras, antes da inoculação em culturas celulares, ou antes, de serem usadas em qualquer teste de diagnóstico, deverão ser processadas adequadamente. Esse processamento, de modo geral, inclui fases de eluição dos vírus da amostra, com uso de salina tamponada; clarificação por centrifugação, para eliminação de resíduos indesejáveis, e descontaminação com agentes antibacterianos e/ou antifúngicos. Evita-se assim, que resíduos tóxicos ou microrganismos contaminantes interfiram no isolamento dos vírus e no diagnóstico

REPLICAÇÃO VIRAL (MODELO BACTERIÓFAGO)

O ácido nucléico do vírus possui poucos genes necessários para a síntese de novos vírus. Entre esses, estão os genes que codificam componentes estruturais, como as proteínas do capsídeo e genes que codificam algumas das enzimas usadas no ciclo de replicação viral. Essas enzimas são sintetizadas e funcionam somente quando o vírus está dentro da célula hospedeira. As enzimas virais estão quase que exclusivamente envolvidas na replicação e no processamento do ácido nucléico viral. As enzimas necessárias para a síntese protéica, os ribossomos, o tRNA e a energia são fornecidos pela célula hospedeira e são usados na síntese de proteínas e enzimas virais

Assim, para que um vírus se multiplique, de precisa invadir a célula hospedeira e tomar conta da sua maquinaria metabólica. Um único vírion pode originar, em uma única célula hospedeira, desde alguns até milhares de partículas virais semente-lhantes. Esse processo pode alterar drasticamente a célula hospedeira, podendo até mesmo causar sua disfunção e morte.

Embora possa variar a maneira pela qual um vírus penetra e se replica dentro da célula hospedeira, o mecanismo básico é muito semelhante para todos os vírus. O ciclo melhor conhecido é o dos bacteriófagos. Os fagos podem se replicarem por dois mecanismos alternativos: o ciclo lítico ou o ciclo lisogênico. O ciclo lítico termina com a lise e a morte da célula hospedeira enquanto que no ciclo lisogênico a célula permanece viva.

Durante o ciclo lítico os vírus bacteriófagos T que são: grandes, complexos e não-envelopados, com uma estrutura característica de cabeça e cauda, possuem a capacidade de infectar a bactéria *E. coli*. O tamanho de seu DNA é somente cerca de 6% do da *E. coli*, apesar de ser suficiente para codificar mais de 100 genes. O ciclo de replicação desses e dos demais vírus

ocorre em cinco estágios distintos: ancoragem ou aderência, penetração, biossíntese, maturação e liberação.

Adsorção: Após uma colisão ao acaso entre as partículas fágicas e as bactérias, ocorre a adsorção. Durante este processo, um sítio de aderência no vírus se ancora ao sítio receptor complementar na bactéria. Os bacteriófagos possuem fibras na extremidade da cauda que servem como sítios de aderência. Os sítios receptores complementares estão na parede bacteriana.

Penetração: Após a aderência, os bacteriófagos injetam seu DNA (ácido nucléico) dentro da bactéria. Para isso, a cauda do bacteriófago libera uma enzima, a lisozima, que destrói uma parte da parede bacteriana. Durante o processo de penetração, a bainha da cauda se contrai, e o centro da cauda atravessa a parede celular. Quando a ponta da cauda alcança a membrana plasmática, o DNA da cabeça do fago passa para a bactéria, através do lúmen da cauda e da membrana plasmática. O capsídeo permanece do lado de fora.

Biossíntese: Assim que o DNA do bacteriófago alcança o citoplasma da célula hospedeira, inicia-se a biossíntese do ácido nucléico e das proteínas virais. A síntese protéica do hospedeiro é interrompida pela degradação do seu RNA induzida pelo vírus, pela ação de proteínas virais que interferem com a transcrição, ou pela inibição da tradução.

O fago usa, inicialmente, nucleotídeos e várias enzimas do hospedeiro para sintetizar muitas cópias do seu DNA. Logo a seguir se inicia a biossíntese das proteínas virais. Todo oRNA transcrito é mRNA do bacteriófago que sintetiza enzimas virais e proteínas do capsídeo viral. Os ribossomos, as enzimas e os aminoácidos do hospedeiro são usados na tradução. Controles genéticos regulam a transcrição de diferentes regiões do DNA do fago durante o ciclo de multiplicação. Por exemplo, mensagens precoces são traduzidas em proteínas virais precoces, que são as enzimas usadas na síntese do DNA viral. Da mesma forma, mensagens tardias são traduzidas em proteínas tardias usadas na síntese das proteínas do capsídeo.

Durante vários minutos após a infecção, não são encontrados na célula hospedeira fagos completos. Somente podem ser detectados componentes isolados - DNA e proteína virais. Durante a multiplicação viral, chama-se período de eclipse, aquele em que ainda não estão formados os vírions completos e infectivos.

Maturação: Nesse processo, vírus completos são formados a partir do DNA e dos capsídeos. Outros componentes virais se organizam espontaneamente formando as partículas virais, eliminando a necessidade de muitos genes não-estruturais e de outros produtos gênicos. As cabeças e as caudas são montadas separadamente a partir de subunidades protéicas: a cabeça é preenchida com DNA viral e se une à cauda.

Liberação: O estágio final da replicação viral consiste na liberação dos vírions da célula hospedeira. O termo lise é geralmente usado para esse estágio da replicação dos fagos porque, nesse caso, a membrana plasmática se

rompe (lisa). A lisozima, que é codificada pelo genoma do fago, é sintetizada dentro da célula e destrói a parede celular, liberando os bacteriófagos recém-produzidos. Os fagos liberados infectam novas células nas proximidades, e o ciclo de multiplicação se repete.

Alguns vírus, ao contrário dos bacteriófagos, não causam lise nem morte da célula hospedeira após a infecção. Esses fagos lisogênicos (também chamados de fagos temperados) podem realizar um ciclo lítico, mas eles também são capazes de incorporar seu DNA ao da célula hospedeira para iniciar um ciclo lisogênico. Na lisogenia, o fago permanece latente inativo. As células bacterianas hospedeiras, nesse caso, são conhecidas como células lisogênicas.

O DNA do fago, originalmente linear, forma um círculo. Esse círculo pode multiplicar-se e ser transcrito, levando à produção de novos fagos e à lise celular (ciclo lítico). Mas alternativamente, o círculo pode sofrer recombinação e se tornar parte do DNA do cromossomo da bactéria (ciclo lisogênico). O DNA do fago inserido chama-se agora profago. A maioria dos genes do profago é reprimida por duas proteínas repressoras codificadas pelo genoma do fago. Esses repressores ligam-se aos operadores, interrompendo, dessa forma, a transcrição de todos os outros genes do fago. Assim são desligados os genes do fago que conduziriam à síntese e à liberação de novos vírus, da mesma forma que são desligados os genes de *E. coli*.

A LISOGENIA APRESENTA TRÊS CONSEQÜÊNCIAS IMPORTANTES:

Em primeiro lugar, as células lisogênicas são imunes à reinfeção pelo mesmo fago (no entanto, não são imunes à infecção por outros tipos de fagos).

A segunda conseqüência é a conversão, isto é, as células hospedeiras podem vir a apresentar novas propriedades. Por exemplo, a bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, que causa a difteria, é um patógeno cujas propriedades causadoras da doença estão relacionadas com a síntese de uma toxina. Essa bactéria só produz a toxina quando possui um fago temperado, pois o gene que codifica para a toxina está no profago. Em um outro exemplo, somente os estreptococos que carregam um fago temperado são capazes de produzir a toxina relacionada com a escarlatina. A toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, que causa o botulismo, é codificada por um gene de um profago, assim como a toxina da cólera, que é produzida por linhagens patogênicas de *Vibrio cholerae*.

A terceira conseqüência da lisogenia é que ela torna possível a transdução especializada. Qualquer gene bacteriano pode ser transferido por esse processo porque o cromossomo do hospedeiro está fragmentado em pequenos pedaços que podem ser empacotados em um capsídeo de fago.

Na transdução especializada. No entanto, somente podem ser transferidos determinados genes bacterianos.

Determinados vírus animais podem sofrer processos muito semelhantes à lisogenia. Os vírus animais que permanecem latentes por longos períodos nas células hospedeiras, sem se multiplicarem e sem causarem doenças, podendo estar inseridos no cromossomo do hospedeiro ou permanecer separados, mas em um estado reprimido (como alguns fagos lisogênicos). Vírus que causam câncer podem também estar latentes.

REPLICAÇÃO DE VÍRUS DNA E RNA

A replicação dos vírus animais segue um padrão básico da replicação dos bacteriófagos, mas apresenta algumas diferenças importantes como:

Os sítios de ancoragem são proteínas da membrana plasmática e envoltório viral;

O capsídeo entra por endocitose ou por fusão;

A decapsidação ocorre por remoção enzimática das proteínas do capsídeo;

A biossíntese ocorre no núcleo ou no citoplasma;

Pode ocorrer latência, infecções lentas ou câncer;

A liberação ocorre por brotamento em vírus envelopados ou por lise da membrana plasmática nos vírus não-envelopados.

Nos bacteriófagos seu mecanismo de entrada na célula hospedeira é diferente. Além disso, uma vez dentro da célula, a síntese e o arranjo dos novos componentes virais são ligeiramente diferentes, em parte devido às diferenças entre as células procarióticas e eucarióticas. Os vírus animais possuem determinadas enzimas não encontradas nos fagos. Finalmente, existem diferenças entre os vírus animais e os fagos quanto aos mecanismos de maturação e liberação e quanto aos efeitos sobre a célula hospedeira.

Os processos comuns aos vírus animais contendo DNA e RNA são aderência, penetração, decapsidação e liberação. Examinaremos, também, as diferenças entre os dois tipos de vírus, com relação aos processos de biossíntese.

Os vírus de RNA multiplicam-se essencialmente da mesma forma que os de DNA, exceto que os diferentes grupos utilizam vários mecanismos para a síntese de mRNA. Embora os detalhes desses mecanismos estejam fora do objetivo deste texto, devemos entender que os vírus de RNA se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira e as principais diferenças entre os processos de multiplicação desses vírus residem na forma como o mRNA e o RNA genômico viral são produzidos. Após a síntese do RNA e das proteínas virais, o processo de maturação é similar a todos os outros vírus animais.

INFECCÕES VIRAIS LATENTES E PERSISTENTES

Um vírus pode permanecer em equilíbrio com o hospedeiro por um longo período de tempo, freqüentemente por muitos anos, sem se replicar ou produzir doença. Os herpes vírus humanos permanecem nas células hospedeiras por toda a vida do indivíduo. Quando os herpes vírus são reativados por imunossupressão (por exemplo, a AIDS), a infecção resultante pode ser letal. A infecção de pele causada pelo vírus do herpes que produz o herpes labial é o exemplo clássico de uma infecção latente. Esse vírus penetra as células nervosas do hospedeiro, mas só causa dano quando for ativado por um "estímulo como febre ou queimadura solar.

Em alguns indivíduos, os vírus são produzidos, mas os sintomas nunca aparecem. Embora uma grande porcentagem da população humana possua o vírus do herpes, somente 10 a 15% dessa população apresenta a doença. Os vírus causadores de algumas infecções latentes existem em estado lisogênico dentro das células hospedeiras.

O vírus da varicela (do gênero *Varicellavirus*) também pode existir, em estado latente. A varicela (catapora) é uma doença de pele, geralmente contraída na infância. Os vírus chegam à pele através do sangue. A partir do sangue, podem também atingir os nervos onde permanecem latentes. Mudanças na resposta imunológica (células T) podem, mais tarde, ativar os vírus latentes, causando herpes zoster. Os exantemas aparecem na pele ao longo do nervo em que o vírus estava latente. Herpes zoster ocorre em 10 a 20% das pessoas que tiveram varicela

As infecções virais persistentes por vírus são mortais. Demonstrou-se, na verdade, que algumas infecções virais persistentes são causadas por vírus convencionais. Por exemplo, o vírus do sarampo é responsável por uma forma rara de panencefalite subaguda esclerosante (SSPE), vários anos após causar sarampo. Uma infecção viral persistente difere aparentemente de uma infecção viral latente porque, na maior parte dos casos, o vírus infeccioso é detectado gradualmente por um longo período, ao invés de aparecer repentinamente

PRÍONS

O nome prion foi originado da expressão *proteinaceous infectious particle* (partícula protéica infecciosa). Existem, atualmente, nove doenças animais incluídas nessa categoria, entre elas, a "doença da vaca louca" que apareceu em bovinos na Grã-Bretanha em 1987. Todas são doenças neurológicas denominadas encefalopatias espongiformes devido ao desenvolvimento de grandes vacúolos no tecido cerebral. As doenças humanas são kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker e insônia familiar fatal. Essas doenças se manifestam

em membros da mesma família, o que indica uma possível causa genética. No entanto, não podem ser puramente herdadas, já que a doença da vaca louca surgiu em bovinos alimentados com ração feita com carne de ovelhas contaminadas com scrapie, e a nova variante (bovina) foi transmitida para indivíduos que ingeriram carne bovina mal-cozida. Além disso, a CJD foi transmitida por tecido nervoso transplantado e por instrumentos cirúrgicos contaminados.

Essas doenças são causadas por uma glicoproteína normal do hospedeiro denominada Prpc, de proteína prion celular, que é convertida em uma forma infecciosa denominada prpsc, de proteína scrapie. A localização da Prpc na superfície da célula sugere que ela pode estar associada com a adesão celular e o reconhecimento celular, ou a incorporação de um elemento.

Nos humanos, o gene para Prpc está localizado no cromossomo 20. A Prpc é produzida pelas células; e secretada para a superfície celular. A Prpsc reage com a Prpc na superfície celular convertendo a Prpc em PrpSc.

A PrpSc é absorvida por meio de endocitose e se acumula nos lisossomos. A causa real do dano celular não é conhecida. Os fragmentos de moléculas Prpsc se acumulam no cérebro, formando placas, que são usadas no diagnóstico post-mortem, mas não parecem ser a causa do dano celular.

ATIVIDADES

1. Por que estudar Virologia?
2. Quais as principais características gerais dos vírus?
3. Justifique. Os vírus não são considerados seres vivos!
4. Em que se baseia a atual sistemática taxonômica dos vírus?
5. Qual a diferença entre as infecções produtivas, latentes e persistentes?
6. Justifique: os vírus só podem ser isolados (cultivados) em sistemas vivos?
7. O que são bacteriófagos?



COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Todos os ambientes naturais do nosso planeta estão albergando vírus e outros microrganismos. Estes vírus infectam todos os seres vivos presentes nestes ambientes. Os resultados destas infecções podem determinar o tipo de seres que irão predominar nestes ambientes e conseqüentemente os produtos metabólicos que serão disponíveis no ambiente natural. Devemos entender a Virologia como uma ciência fundamental para compreensão destas alterações e destes processos inclusive do ponto de vista evolutivo.

2. Conhecer as características gerais dos vírus é importante para

estabelecer parâmetros e estratégias utilizados nas diversas medidas de controle, profilaxia, diagnóstico, imunização, novas biotecnologias e outras. Podemos utilizar estas características virais como modelos biológicos eficientes.

3. Todos os seres vivos possuem características comuns! Devemos pesquisar quais são estas características e como os vírus se apresentam. Entender melhor as diferenças entre multiplicar e replicar; dividir e reproduzir.

4. Com o avanço do conhecimento científico (Biotecnologia, Bioinformática, Biologia Molecular, Celular e outras) novas fontes de informação são utilizadas para a caracterização dos microrganismos. Estas informações são fundamentais para a sistemática. Os acadêmicos devem conhecer estas novas ferramentas e como utilizá-las.

5. Os vírus podem infectar uma ampla gama de hospedeiros e células. Estas infecções podem determinar diferentes alterações no metabolismo das células infectadas. Tais modificações são muito importantes para a avaliação diagnóstica, terapêutica e medidas de prevenção e controle das doenças virais. Políticas de saúde pública como campanhas de vacinações e de educação e saúde são baseadas nas possíveis infecções. Os profissionais das áreas de saúde, meio ambiente, agricultura, pecuária e ciências biológicas devem conhecer tais diferenças e implicações de cada caso.

6. Durante a discussão sobre os vírus serem partículas inanimadas foram apresentadas suas características gerais. A partícula viral não possui enzimas do metabolismo energético para obtenção e utilização de energia. Como ele pode se replicar?

7. A origem da palavra bacteriófagos significa “O que come bactérias”. Se o vírus não utiliza metabolismo próprio como ele pode ser o que “comer bactérias”?

CONCLUSÃO

A Virologia é uma ciência cujo campo de atuação engloba o estudo de diversas particulares sub-microscópicas: os vírus, viroídes, virusóides e príons. Esta área do conhecimento teve seu início com a descoberta de um agente infeccioso que não era retido em filtros de porcelana. É uma área que tem grande importância nas ciências básicas e aplicadas. São muitas as áreas de estudo da Virologia. Além das áreas básicas e aplicada podemos destacar o estudo dos vírus bacteriófagos, aplicação de vírus em novas biotecnologias, Virologia veterinária, Virologia clínica médica humana, terapia e desenvolvimento de drogas anti virais, virologia vegetal entre outras. Como

já foi apresentado em capítulos anteriores ocorreram profundas mudanças no curso das civilizações, decorrentes das doenças infecciosas, se as doenças virais representam aproximadamente setenta por cento destas, podemos afirmar que os vírus foram decisivos. Como os vírus também servem de modelos biológicos sofisticados tornam-se importantes ferramentas para estudos. Seu monitoramento ambiental com isolamento, identificação e caracterização são fundamentais para o estabelecimento de políticas nacionais e internacionais de prevenção de futuras epidemias e pandemias.

RESUMO

Os vírus não são considerados organismos vivos. No entanto, quando penetram em uma célula ocorre a replicação viral, onde é produzidos novos vírus. Os vírus podem causar infecção e doença, da mesma forma que outros agentes infecciosos como bactérias, fungos e protozoários. Os vírus podem ser definidos como partículas extremamente pequenas (20 a 100 nm) parasitas intracelulares obrigatórios, possuem um único tipo de ácido nucléico, DNA ou RNA, possuem uma cobertura protéica (às vezes recoberta por um envelope de lipídeos, proteínas e carboidratos) envolvendo o ácido nucléico, replica-se dentro de células vivas usando o metabolismo de síntese das células para produzirem novos vírus e induzem a síntese de estruturas especializadas capazes de transferir o ácido nucléico viral para outras células. Os vírus possuem um amplo espectro de hospedeiros podendo infectar de bactérias (bacteriófagos) ao homem, animais e vegetais. Os vírus são formados basicamente por ácido nucléico, capsídeo e envelope. O ácido nucléico pode ser DNA ou RNA simples ou duplos. O capsídeo é de natureza protéica sendo constituído por subunidades chamadas de capsômeros. O envoltório de natureza lipoglicoprotéica tem origem da membrana celular citoplasmática, da célula infectada. Quanto a morfologia os vírus podem ser helicoidais, poliédricos e complexos. A taxonomia dos vírus é bastante complexa e se baseia atualmente em: (1) no tipo de ácido nucléico, (2) no modo de replicação e (3) na morfologia. As principais famílias de vírus que infectam o homem e os animais são: Família Parvoviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Rabdoviridae gênero Vesiculovirus, Lyssavirus; Filoviridae, Paramixoviridae, Deltaviridae, Orthomixoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Retroviridae e Reoviridae. Os vírus bacteriófagos podem ser isolados da natureza e cultivados em laboratório tanto em culturas bacterianas em meio líquido em suspensão ou, em meio semi-sólido. O cultivo de um vírus animal é limitado pela necessidade de um tecido vivo em que as células possuam receptores apropriados podemos utilizar: cultivo de células, animais de laboratório ou ovos embrionados de galinha ou ganso. Para a identificação dos vírus podemos utilizar: o ELISA,



Western Blotting, a observação dos efeitos citopáticos dos vírus nas células hospedeiras e os métodos moleculares modernos como as análises do polimorfismo (RFLPs) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os vírus se replicam por um processo bastante complexo e particular de cada partícula, entretanto observamos cinco estágios comuns a todos os vírus: ancoragem ou aderência, penetração, biossíntese, maturação e liberação. A replicação pode ser lítica gerando lise da célula infectado ou lisogênico formando um genoma proviral que se integra ao genoma da célula hospedeira. As infecções virais podem ser produtivas, latentes ou persistentes. Infecções produtivas são aquelas que ocorrem a produção de novos vírus com a manifestação da síndrome sônica. As infecções latentes são aquelas sem a produção de novos vírus e persistentes aquelas com produção de novos vírus durante toda a vida do hospedeiro. Os príons também são estudados na virologia. O nome príon foi originado da expressão proteínaceous infectious particle (partícula protéica infecciosa). Existem, atualmente, nove doenças animais incluídas nessa categoria. Todas são doenças neurológicas denominadas encefalopatias espongiformes devido ao desenvolvimento de grandes vacúolos no tecido cerebral. Essas doenças são causadas por uma glicoproteína normal do hospedeiro denominada Prpc, que é convertida em uma forma infecciosa denominada prpsc.

REFERÊNCIAS

- BLACK, J. G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4^a. Ed. Guanabara Koogan, 2002.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PAKER, J. Microbiologia de Brock. 10^a ed. São Paulo: Printece Hall do Brasil, 2004.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. PFALLER, M.A. Microbiologia Médica. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8^a ed. São Paulo: Artmed, 2005.