

Raul Emanuel Lopes Brandão

Vírus e Retrovírus

Contributo para a Evolução das Espécies



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2015

Vírus e Retrovírus

Contributo para a Evolução das Espécies

Raul Emanuel Lopes Brandão

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

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Magalhães

Vírus e Retrovírus

Contributo para a Evolução das Espécies

Sumário

Durante os primeiros 30 anos do século XX a virologia expandiu-se consideravelmente através da caracterização de um número crescente de doenças humanas, animais e vegetais, causada por vírus. Ivanoski atribui aos vírus duas características essenciais, a sua dimensão submicroscópica e a sua infecciosidade (Ferreira e Sousa, 1998).

A descoberta do microscópio eletrónico em 1931 veio revolucionar a virologia, confirmando a dimensão submicroscópica dos vírus, permitindo desta forma a primeira classificação racional de vírus (Flint et al., 2009).

Os vírus são o produto de uma rede complexa de diferentes forças evolutivas. Eles prosperam mantendo uma interação contínua com os seus hospedeiros e estão sujeitos a uma multiplicidade de forças seletivas e mudanças estocásticas. A rápida produção de diversidade genética é uma característica exclusiva de certas linhagens virais, tem notáveis consequências epidemiológicas, e confere grande valor sobre vírus como sistemas modelo para a compreensão do processo evolutivo. Numa escala de tempo evolutiva, os vírus eram (e continuam a ser) um controlador evolucionário importante ao permitir a transferência do material genético entre as espécies hospedeiras e a criação de inovação genética por endossimbioses (F. Pereira, A. Amorim, 2013).

Os vírus têm a capacidade de infetar células e assim replicar-se, para isso é necessário que a célula possua recetores aos quais o vírus se liga, e maquinaria celular necessária e ativa, a qual permite a síntese e montagem dos seus componentes (Wagner e Hewlett, 2004).

Para que a replicação do vírus seja eficaz estão subjacentes diferentes etapas. Numa primeira fase ocorre o reconhecimento da célula alvo e a ligação do vírus à célula por adsorção. De seguida há a penetração do vírus, perda da cápside do vírus, síntese de macromoléculas, montagem do vírus e por fim a libertação do vírus (Wagner e Hewlett, 2004).

As partículas virais são muito mais abundantes do que as celulares e os genes virais superam em número os genes celulares presentes na biosfera. Os genomas celulares abrigam genes de muitos vírus integrados enquanto os genes celulares são raros em genomas virais. O fluxo de genes de vírus para a célula é portanto esmagador quando comparado com o caso oposto. Novos genes virais surgem continuamente durante a replicação / recombinação de genomas virais na célula hospedeira. Estes genes podem se tornar 'genes celulares' quando o genoma viral integrar o celular. Juntamente com o braço de ferro entre os vírus e as células, isto explica o porquê dos vírus terem desempenhado um dos principais papéis na configuração do conteúdo genético celulares. Vários casos documentados demonstram que os vírus têm estado envolvidos no desenvolvimento de inovações evolucionárias. Dando crédito às hipóteses que sugerem que os vírus têm desempenhado um papel importante na formação de células modernas (Patrick Forterre, David Prangishvili.,2013).

O estudo da genética molecular do vírus tem produzido um corpo considerável de pesquisa sobre as sequências e relações filogenéticas de vírus que afetam humanos e animais. A revisão dessa literatura sugere que os seres humanos têm sido atingidos por vírus em toda a sua história evolutiva, embora o número e os tipos tenham mudado. Alguns vírus mostram evidências de um relacionamento e co especiação de longa data com homínídeos, enquanto outros foram mais recentemente adquiridos de outras espécies, incluindo macacos Africanos e símios, ao longo da nossa linha evolutiva nesse continente, e animais domésticos e roedores desde o Neolítico. Vírus partilhados poderiam ter afetado a diversidade de espécies de homínídeos, através da promoção da divergência e eliminando as populações anfitriãs menos resistentes, enquanto os vírus transportados por seres humanos e outros animais que migraram para fora de África poderão ter contribuído para declínios de outras populações. A inserção de retrovírus endógenos desde a divergência entre os humanos e os chimpanzés foi capaz de afetar diretamente a evolução dos homínídeos através de mudanças na expressão e desenvolvimento de genes. (Van Blerkom, L. M., 2003).

Para o tratamento de doenças causadas por vírus são utilizadas substâncias antivirais. Estes fármacos actuam nas diferentes fases da replicação vírica, tendo como principal objectivo a inibição da replicação. A incidência de variadas patologias causadas por

vírus, levaram as empresas farmacêuticas a lançarem programas para encontrar químicos com actividade antiviral. Moléculas promissoras foram modificadas sistematicamente por químicos medicinais a fim de reduzir a toxicidade, aumentar a biodisponibilidade, solubilidade e melhorar as propriedades farmacocinéticas (Flint et al., 2009).

Nas últimas décadas foram realizadas várias pesquisas em substâncias antivirais, que necessitam de apresentar eficácia e segurança, este é um processo demorado e caro. A falta de sucesso deve-se muitas vezes ao facto de os compostos antivirais interferirem não só com o crescimento de vírus bem como afetarem negativamente a célula hospedeira, uma vez que cada etapa do ciclo viral envolve funções celulares (Flint et al., 2009).

O desenvolvimento e a pesquisa de novos agentes antivirais são um processo demorado e caro. Um dos problemas com a produção de substâncias antivirais esta na rápida dinâmica das infeções virais que muitas vezes por falha de diagnósticos rápidos torna obsoletos os próprios tratamentos que pecam por se tardios (Abrantes et al., 2010).

Palavras-chaves: vírus, evolução, retrovírus, recombinação, antivirais.

Abstract

In the first 30 years of the twentieth century Virology expanded considerably through the characterization of a growing number of human diseases, animals and plants, caused by viruses. Ivanoski gives two essential characteristics of the virus, its submicroscopic scale and its infectivity (Ferreira and Sousa, 1998).

The discovery of electron microscopy in 1930 revolutionized Virology, confirming the submicroscopic size of viruses, thus allowing the first rational classification virus (Flint *et al.*, 2009).

The viruses are obligatory intracellular parasites which the viral genome is composed of DNA or RNA. They consist of a capsid composed of subunits called capsomeres. Its main functions are based on protecting the nucleic acid of adverse conditions and animals bound to host cells. Some viruses also possess an envelope consisting of protein but mainly phospholipids, with an important role in the cell cycle, particularly in the binding and fusion cells (Ferreira and Sousa, 1998).

The virus is capable of infecting a cell and thus replicate, this requires that the cell possesses receptors to which the virus binds and activates cellular machinery required and which allows the synthesis and assembly of its components (Wagner and Hewlett, 2004).

For the replication of the virus is effective underlie different stages. Initially occurs recognition of the target cell and virus binding to the cell by adsorption. Then there is the penetration of the virus, the virus capsid loss, macromolecule synthesis, and virus assembly in order to release virus (Wagner and Hewlett, 2004).

The molecular genetics study of the virus has produced a number of studies on the sequences and phylogenetic relationships of viruses that affect humans and animals. A review of the literature suggests that humans have been affected by viruses throughout their evolutionary history, although the number and types have changed. Some viruses show evidence of a relationship and longstanding cospeciation with hominids, while

other viruses were recently acquired by the human from other species, including African monkeys and apes, throughout our evolutionary line was that continent, and pets and rodents from the Neolithic. Shared virus could have affected the diversity of species of hominids, through the promotion of divergence and elimination of host populations less resistant. Moreover, the viruses carried by humans and other animals that have migrated out of Africa could have contributed to declines in other populations. The insertion of endogenous retroviruses since the divergence of humans and chimpanzees was able to directly affect the evolution of hominids through changes in the expression of genes and development. (Van Blerko, 2003).

For the treatment of diseases caused by viruses antiviral substances are used. These drugs act at different stages of viral replication, with the primary objective of inhibiting replication. The incidence of various diseases caused by viruses led pharmaceutical companies to launch programs to find chemical with antiviral activity. Promising Molecules were systematically modified by medicinal chemists in order to reduce the toxicity, increasing bioavailability, solubility and improved pharmacokinetic properties (Flint *et al.*, 2009).

In recent decades there have been several research on antiviral substances, although they are very potent and safe is a time consuming and expensive process. The lack of success is due to the fact that often the antiviral compounds interfere not only with the virus growth and adversely affecting the host cell, since each step of the viral cycle involves cellular functions (Flint *et al.*, 2009).

The development and research of new antiviral agents is a lengthy and expensive process. One of the problems with the production of antiviral substances in this fast dynamics of viral infections that often failed by rapid diagnostic makes obsolete the very treatments that sin by being late. The broad spectrum of antiviral are the future against most viral infections against DNA and RNA viruses (Abrantes et al., 2010).

Keywords: virus, evolution, retroviruses, recombination, antiviral.

Metodologia

Face ao exposto, a realização deste trabalho teve como objetivo efetuar uma análise bibliográfica sobre vírus e retrovírus, bem como, o seu contributo para a evolução das espécies. Assim sendo, esta dissertação é de índole teórica, estando desta forma isenta de qualquer tipo de trabalho prático experimental.

Em termos metodológicos e tendo por base os objetivos delineados para o desenvolvimento da mesma, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos e outras publicações, num período compreendido entre os meses de setembro de 2014 e maio de 2015, através das fontes de pesquisa científicas: PubMed, o Science Direct e a b-On e em motores de busca como o Google Académico e o AltaVista Search. A utilização das mesmas deve-se ao facto de serem as bases de dados que procedem à compilação dos artigos científicos mais recentes publicados na área da saúde. As palavras utilizadas na pesquisa foram: vírus, evolução, retrovírus, recombinação, antivirais.

Os critérios utilizados na seleção dos artigos resultantes da pesquisa científica incluíram géneros de interesse para o tema, limitando a pesquisa para artigos científicos e estudos escritos em inglês e português, com data de publicação de um período de 10 anos ou de ano anteriores cujo conteúdo é relevante e ainda com evidências experimentais acerca do tema dos quais se retirou a informação e os dados que conduziram à escrita desta tese.

Agradecimentos

Dedico este espaço a todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, me ajudaram a cumprir os meus objetivos e a realizar mais uma etapa da minha formação académica.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Magalhães, pela sua disponibilidade, pelo saber que me transmitiu, pelas opiniões e críticas e pela total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização desta monografia.

Aos meus Amigos pelo apoio, motivação e amizade que me possibilitou uma melhor experiência académica ao longo de todo o percurso.

E concluo com um especial agradecimento à minha Família, aos meus Pais, aos meus Avós e à minha Irmã, por acreditarem sempre em mim e por tudo que sempre fizeram por mim.

Índice

Sumário	i
Abstract	iv
Metodologia	vi
Agradecimentos	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1. História dos Vírus	2
1.2. Os Vírus	3
1.3. Nomenclatura Viral.....	11
2. Evolução	13
2.1. A Coevolução do Vírus e o Hospedeiro	16
2.2. Importância das Vias de Transmissão	18
2.3. Os vírus e a Evolução das Espécies	20
3. Vírus como Vetores na Tecnologia do DNA Recombinante	28
3.1. Terapia Genética	30
4. Conclusão	38
5. Bibliografia	40

Índice de figuras

Figura 1. John Franklin Enders, Thomas H. Weller e Frederick Chapman Robbins, prémio Nobel da medicina em 1954.

Figura 2. Esquema comparativo dos tamanhos de diversos vírus. (Adaptado de Lopes e Rosso, 2010).

Figura 3. Diferentes tipos de cápsides víricas: a) Cápside do bacteriófago *T-even virus* (*Myoviridae*) com cabeça poligonal e cauda em forma de espiral, b) Vírus Herpes simplex (*Herpesviridae*) com cápside poligonal e membrana externa, c) Adenovírus humano 2 (*Adenoviridae*) com cápside poligonal sem membrana. d) Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (*Retroviridae*). e) Vírus do mosaico do tabaco (*Tobamovirus*) com cápside em espiral.

Figura 4. Estrutura geral de um vírus com invólucro e sem invólucro.

Figura 5. Esquema de penetração de vírus com invólucro: (a) endocitose e lise da vesícula; (b) fusão entre o cápside viral e a membrana plasmática para a libertação do material genético viral.

Figura 6. Esquema da transcrição do genoma viral dos sete grupos segundo a classificação de Baltimore.

Figura 7. Esquema simplificado da transferência de informação genética nos organismos celulares.

Figura 8. Vírus da família *Herpesviridae*.

Figura 9. Representação esquemática do processo de multiplicação dos três diferentes tipos de vírus de RNA de cadeia simples: vírus de cadeia + (A), vírus de cadeia - (B) e o retrovírus (C).

Figura 10. Esquema representativo do processo de coevolução do vírus no hospedeiro.

Figura 11. Sincício-fusão de várias células infetadas por um vírus.

Figura 12. Principais vírus usados como vetores na terapia genética.

Figura 13. Etapas envolvidas na terapia genética com um vetor viral.

Figura 14. Estratégias usadas na terapia genética *in vivo* e em *ex vivo*.

Figura 15. Distribuição dos protocolos clínicos por tipo de vetor (A) e segundo as patologias (B).

Índice de tabelas

Tabela 1. Regras de nomenclatura para a classificação dos vírus.

Tabela 2. Métodos Biológicos utilizados na introdução de genes em células de mamíferos.

Abreviaturas

AAV - Vírus adenoassociados

cDNA – DNA Complementar

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsDNA - Vírus de DNA cadeia dupla

dsRNA - Vírus RNA cadeia dupla

ssDNA - Vírus de DNA cadeia simples

ssRNA - Vírus RNA cadeia simples

ICNV - *Internacional Committee on Nomenclature of Viruses*

ICTV - *Internacional Committee on Taxonomy of Viruses*

MoMuLV - Vírus da leucemia murina de Moloney

RNA - Ácido ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

S3H - Helicases da superfamília 3

SV40 - *Simian virus 40*

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

1. Introdução

Os vírus são muitas vezes considerados como fragmentos de DNA ou RNA celular que escaparam há muito tempo de cromossomas celulares e que evoluíram mais tarde através da captura de genes adicionais dos genomas dos seus hospedeiros. No entanto, essa visão agora tem sido desafiada pela descoberta de uma surpreendente homologia entre os vírus e os hospedeiros distantemente relacionados, e através análises filogenéticas que sugerem a transferência de genes de vírus para as células (Filée et al.,2003).

Existem muitas razões para acreditar agora que os vírus são mais antigos do que as células modernas e sempre foram mais abundantes e diversos do que os seus alvos celulares (Forterre e Prangishvilia, 2009).

Os avanços na genómica dos vírus e as formas de vida celulares têm grandemente estimulado o interesse nas origens e evolução. Os vírus são companheiros ubíquos das formas de vida celulares, parece que cada organismo celular estudado tem o seu próprio vírus ou, pelo menos, elementos genéticos egoístas semelhantes a vírus (Koonin *et al.*,2006).

De acordo com estas novas hipóteses, vírus desempenharam um papel crítico nas transições evolutivas principais, tais como a invenção de DNA e mecanismos de replicação de DNA, a formação dos três domínios da vida, ou ainda, a origem do núcleo eucariótico (Forterre, 2006).

“Os cientistas atualmente são capazes de isolar os vírus que infetaram animais ancestrais e que contribuíram para o aparecimento dos animais placentários, inclusive o próprio homem. O nosso DNA contém as suas pegadas. Identificamos as infeções que acometeram desde homínídeos ancestrais até o homem moderno, desde a nossa separação dos macacos até às doenças adquiridas em África, inclusive a tuberculose, companheira eterna do homem”.

A História da Humanidade Contada pelos Vírus
Stefan Cunha Ujvari

1.1. História dos Vírus

Os vírus foram descobertos em 1892 pelo biólogo Russo-Ucraniano Dmitri Iwanowski e em 1898 Martinus Beijerinck, demonstrando, que o agente causador da doença do fumo, chamada de doença do mosaico do tabaco, era um agente infinitamente microscópico capaz de penetrar filtros de porcelana, algo que não era possível nas bactérias.

Em 1898 foi descoberto o primeiro vírus animal por Friedrich Loeffler e Paul Frosch responsável pela febre aftosa. Trabalhando juntos com Kock, filtraram o líquido contendo o agente causador da doença e observaram que esse líquido ainda permanecia infeccioso mesmo depois do processo de filtração. Substituindo a membrana filtrante por outra com poros de menores dimensões, conseguiram filtrar o agente patológico e comprovar que este era constituído por partículas e não por um líquido. Também provaram que algumas formas dessas partículas possuíam a capacidade de se replicar. A partir desta data a virologia torna-se uma disciplina científica. Contudo, só na década de 1940 e devido ao avanço das técnicas microscópicas, nomeadamente, a microscopia eletrónica é que os vírus foram observados.

No início do século XX, em 1915, Frederick Twort e em 1917, Félix d'Herelle, descobriam que as bactérias poderiam ser infetadas por vírus. No ano de 1935, Wendell Stanley cristalizou o vírus do mosaico do fumo e descobriu que eram compostos, na sua maioria por proteínas. Em 1949, John Franklin Enders, Thomas H. Weller e Frederick Chapman Robbins, (figura 1), desenvolveram, em conjunto, uma técnica para reproduzir o vírus da poliomielite em culturas de células vivas de animais. Com este trabalho estes três cientistas receberam, em 1954, o prémio Nobel da medicina.

Apesar dos primeiros estudos das viroses surgissem no início do século, foi a partir de 1931, com o aparecimento do microscópio eletrónico, que a composição química e estrutura dos vírus foram conhecidas.

Em 1966, foi criado o *Internacional Committee on Nomenclature of Viruses* (ICNV) que agrupou os vírus num único sistema, independente das outras formas biológicas até

então conhecidas. Em 1973, este comité altera o nome do comité para *Internacional Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), como é atualmente conhecido. Nesse mesmo ano os virologistas organizaram os vírus em níveis hierárquicos de ordem, família, subfamília, género e espécie, além de níveis mais baixos de hierarquia (Santos, N. S. O. *et al.* 2008).



Figura 1. John Franklin Enders, Thomas H. Weller e Frederick Chapman Robbins, prémio Nobel da medicina em 1954. (<http://www.nobelprize.org>).

1.2. Os Vírus

Os Vírus, do latim *virus*, "veneno" ou "toxina", são pequenos agentes infecciosos (20-400 nm de diâmetro), (figura 2), que na sua maioria só são visíveis a microscópio eletrónico e apresentam o genoma constituído por uma ou várias moléculas de ácido nucleico, o ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA), as quais podem ser formadas por cadeias simples ou duplas.

O material genético ou genoma dos vírus pode ser organizado de diversas formas, uma característica dos vírus diferente de qualquer outro organismo. Os restantes organismos utilizam apenas o DNA para armazenar a informação genética, no entanto, os vírus podem utilizar o DNA ou RNA, estando o material genético do vírus protegido por um involucro proteico, a cápside.

De um modo generalizado os vírus são extremamente pequenos, sendo a maior parte menor que as bactérias. No entanto, alguns vírus podem ser maiores que as bactérias como é o caso do Ebolavirus, figura 2 (Lopes e Rosso, 2010).

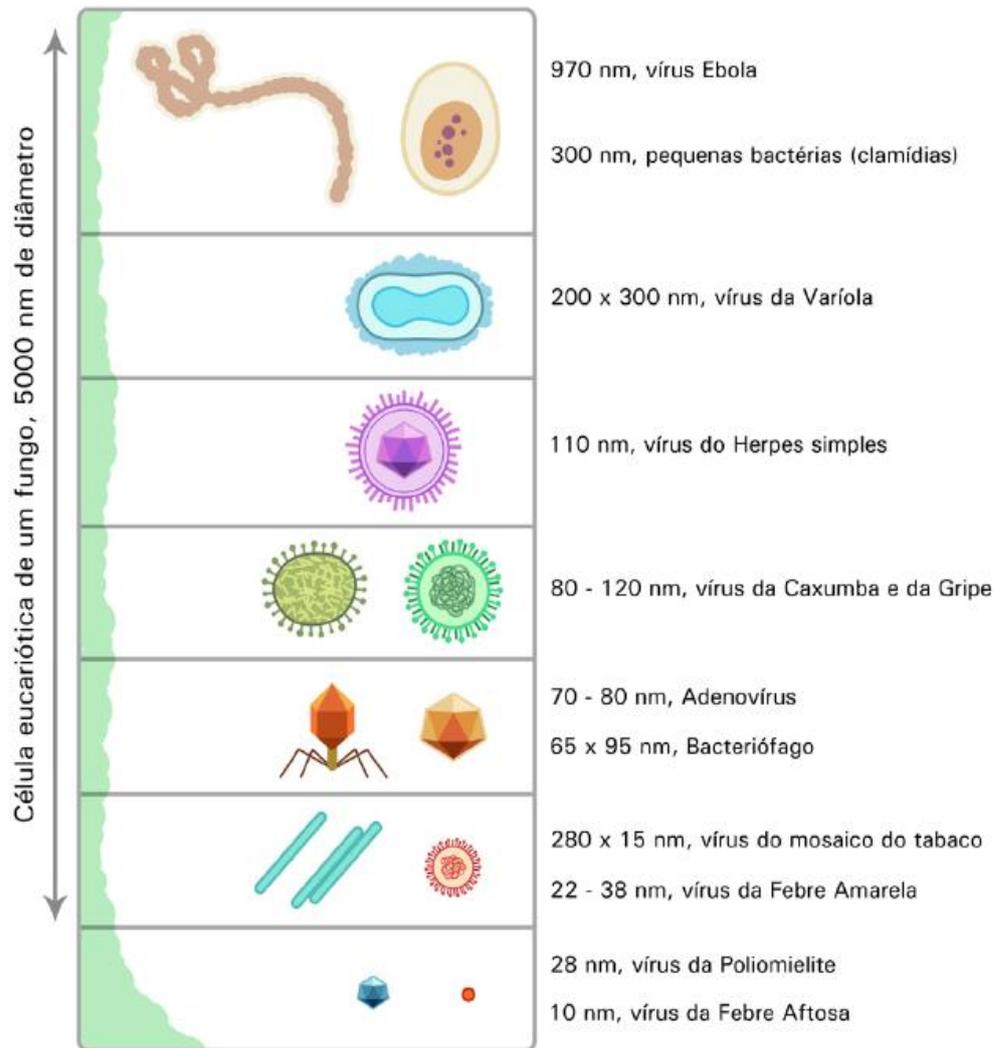


Figura 2. Esquema comparativo dos tamanhos de diversos vírus. (Adaptado de Lopes e Rosso, 2010).

As cápsides podem apresentar diversas formas, algumas são estruturas geométricas regulares, outras apresentam uma forma em espiral e as restantes são mais complexas, sendo constituídas por uma cabeça e uma cauda, figura 3.

Vírus e Retrovírus
Contributo para a Evolução das Espécies

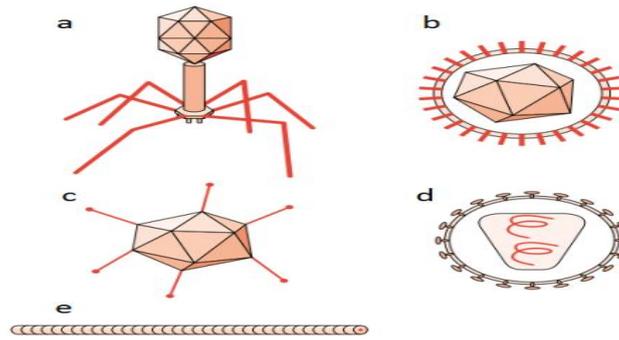


Figura 3. Diferentes tipos de cápsides víricas: a) Cápside do bacteriófago *T-even virus* (*Myoviridae*) com cabeça poligonal e cauda em forma de espiral, b) Vírus Herpes simplex (*Herpesviridae*) com cápside poligonal e membrana externa, c) Adenovírus humano 2 (*Adenoviridae*) com cápside poligonal sem membrana. d) O vírus da imunodeficiência humana (VIH) (*Retroviridae*). e) Vírus do mosaico do tabaco (*Tobamovirus*) com cápside em espiral. (McKenna e Faulkner, 2001).

Alguns vírus também possuem um involucro externo á cápside, composto por uma bicamada fosfolipídica e por proteínas imersas nessa bicamada designada de involucro, que lhes conferem uma proteção extra e facilita entrada do vírus nas células. Um exemplo de vírus que possui involucro é o vírus da imunodeficiência humana (VIH), figura 4 (McKenna e Faulkner, 2001).

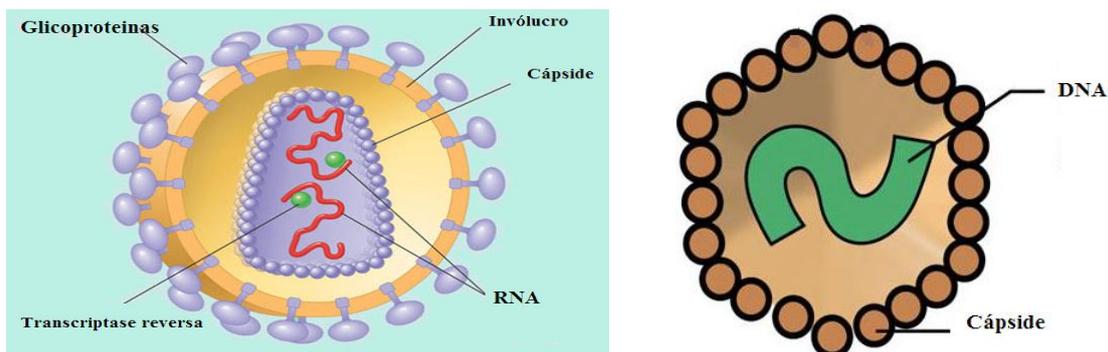


Figura 4. Estrutura geral de um vírus com involucro e sem involucro (<http://thegeneticsofvirusesandbacteria.weebly.com>).

A infecção de uma célula por parte de um vírus com membrana pode ocorrer através da fusão com a membrana celular introduzindo a cápside no interior das células, que

posteriormente libertará o material genético. Nos vírus sem membrana existe a hipótese da infecção poder ser desencadeada através de proteínas especializadas para introduzir o material genético nas células, figura 5. Após as moléculas de DNA ou RNA viral se instalarem no citoplasma das células hospedeiras, apropriam-se da maquinaria metabólica da célula para produzir réplicas do seu genoma bem como das proteínas necessárias à formação dos novos viriões (McKenna e Faulkner, 2001).

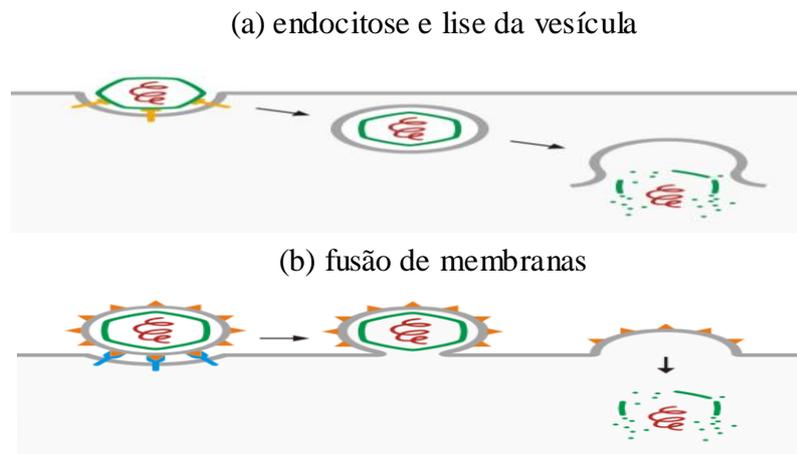


Figura 5. Esquema de penetração do vírus (a) endocitose e lise da vesícula; (b) fusão entre o cápside viral e a membrana plasmática para a libertação do material genético viral (<http://pt.wikipedia.org/wiki/V%C3%ADrus>).

Os genomas de vírus são extremamente reduzidos, os vírus não apresentam organização celular nem organelos ou ribossomas e não produzem a sua própria energia metabólica, contrariamente aos organismos celulares, os vírus não são capazes de crescer em tamanho e de se dividirem autonomamente.

Assim sendo, necessitam de invadir células tornando-as em hospedeiros para se poderem replicar e reproduzir. Por estes motivos, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios que obtêm a partir do hospedeiro, os aminoácidos, os nucleotídeos, os ribossomas e a energia metabólica.

A classificação baseada na síntese viral de RNA mensageiro (mRNA), genoma viral e replicação do DNA (Classificação de Baltimore) agrupam os vírus em sete classes distintas, figura 6 (Madigan, *et al.*, 2004).

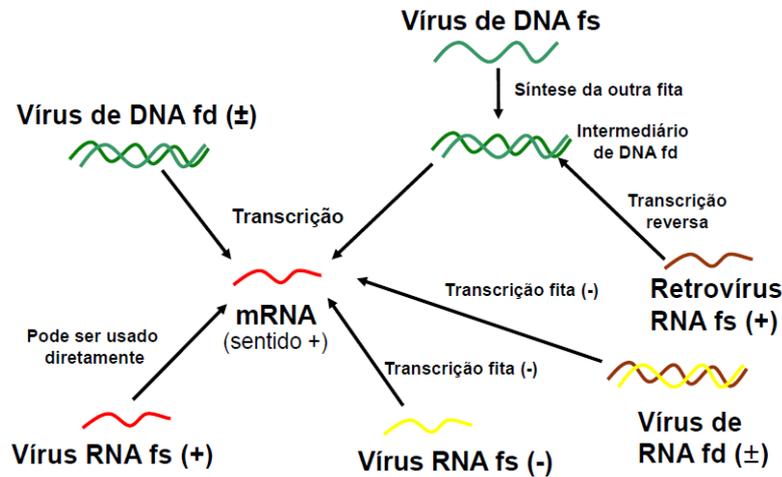


Figura 6. Esquema da transcrição do genoma viral dos sete grupos segundo a classificação de Baltimore (Madigan, *et al.*, 2004).

Classe I: Vírus de DNA cadeia dupla (dsDNA). Os vírus desta classe conseguem construir diretamente o RNAm. Exemplo: Adenovirus, Herpesvirus, Poxvirus.

Classe II: Vírus de DNA de cadeia simples (ssDNA). Esta classe pode ser subdividida em duas classes: vírus de DNA de cadeia simples positiva e vírus de DNA de cadeia simples negativa, contudo, ambos utilizam um intermediário de dsDNA para sintetizar o mRNA. Exemplo: Parvovirus.

Classe III: Vírus RNA cadeia dupla (dsRNA). Esta classe produz o mRNA diretamente. Exemplo: Reovirus.

Classe IV: Vírus RNA cadeia simples positivo [(+)ssRNA]. Exemplo: Picornavirus, Togavirus.

Classe V: Vírus RNA cadeia simples negativo [(-)ssRNA]. Nesta classe o RNA é o mRNA. Nesta classe o RNA é complementar ao mRNA, servindo para a síntese das várias moléculas de RNA (+) necessárias para tomar o controle da célula hospedeira. Exemplo: Orthomyxovirus, Rhabdovirus.

Classe VI: Vírus RNA cadeia simples (ssRNA) com intermediário dsDNA. A transcriptase reversa viral forma uma molécula de DNA que então sofre o processo de transcrição por ação das enzimas do hospedeiro. Exemplo: Retrovirus.

Em termos de morfologia, os genomas virais podem estar organizados em círculos como é o caso do vírus da hepatite B, também podem ser lineares como o VIH ou até mesmo ser compostos de diversos pequenos fragmentos lineares como o vírus da gripe. Estas características servem para classificar os vírus em diferentes grupos. O genoma viral pode adquirir essas formas independentemente do tipo de ácido nucleico utilizado. O genoma viral pode ainda estar organizado como uma cadeia simples ou uma cadeia dupla, também independentemente do ácido nucleico ou do formato (Madigan, et al., 2004).

Em termos gerais, a transferência de informação genética nos organismos celulares dos domínios da *Eukarya*, da *Bacteria* e da *Archaea*, pode ser representado, em termos gerais segundo a figura 7.



Figura 7. Esquema simplificado da transferência de informação genética nos organismos celulares (<http://hypescience.com>).

Nestes organismos toda a informação genética necessária para a vida encontra-se primariamente nas moléculas de DNA, para posterior transcrição para as moléculas de RNA. Contudo, nos vírus, essa generalização não se aplica em todos os casos, ou seja o

material genético primário dos vírus pode estar no DNA como no RNA, destacando-se assim três tipos de vírus: o vírus do DNA, o vírus do RNA não retrovírus e o vírus do RNA retrovírus.

Nos vírus de DNA, o material genético encontra-se no DNA e a transferência da informação genética ocorre do DNA para o RNA e seguidamente para as proteínas. Um exemplo desse grupo de vírus são os vírus da família *Herpesviridae*, na qual os vírus apresentam morfologia esférica, com invólucro e medem entre 150 a 200 nm de diâmetro, (figura 8). Os vírus desta família podem provocar herpes mas também provocam varicela, encefalites, danos em fetos e recém nascidos, mononucleose infecciosa, entre outras. Outros exemplos de vírus de DNA são os vírus do género *Orthohepadnavirus*, pertencentes à família *Hepadnaviridae*. Estes são vírus esféricos com invólucro de aproximadamente 42 nm de diâmetro responsáveis por hepatites agudas, fulminantes e crónicas que podem evoluir para cirrose ou carcinomas hepatocelulares. Um exemplo de espécie de vírus pertencentes a este género é o vírus hepatitis B, é transmitido através do contacto com o sangue ou outros fluidos corporais provenientes de uma pessoa infetada, é uma infeção viral que ataca o fígado e podendo resultar em patologias agudas e crónica, podendo ser prevenida através da vacinação, método mais segura e eficaz atualmente disponível (Lopes e Rosso, 2010).

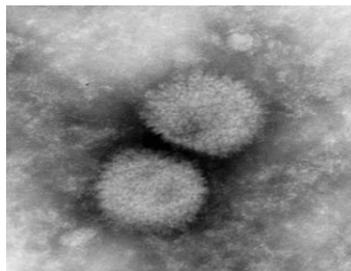


Figura 8. Vírus da família *Herpesviridae* (<http://www.virtualmuseum.ca>).

Nos vírus de RNA que não são retrovírus o material genético encontra-se no RNA e não possuem a enzima transcriptase reversa podendo ser divididos em três tipos: os vírus de cadeia positiva, vírus de cadeia negativa ver (figura 9), e vírus de cadeia dupla.

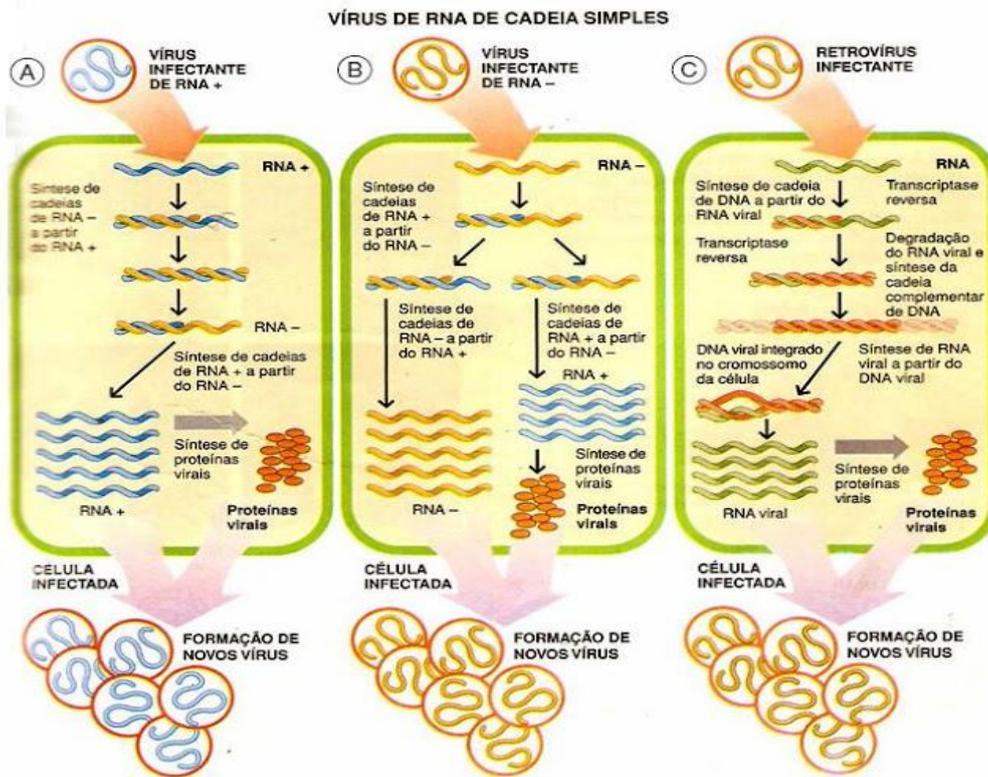


Figura 9. Representação esquemática do processo de multiplicação dos três diferentes tipos de vírus de RNA de cadeia simples: vírus de cadeia + (A), vírus de cadeia - (B) e o retrovírus (C) (Amabis e Martho 2009).

Os vírus de cadeia positiva são aqueles cujo RNA do genoma apresenta a mesma sequência de bases azotadas que os mRNA por eles produzidos. Na célula hospedeira, a molécula de RNA viral chamada cadeia positiva funciona como modelo para a síntese de moléculas de RNA complementares ou cadeia negativa que, por sua vez, atuam como modelo para a produção de cadeias complementares ou seja a cadeia positiva. Algumas dessas cadeias positivas são utilizadas como mRNA e permitem a síntese das proteínas virais e as outras cadeias positivas fazem parte do genoma dos novos vírus formados na célula infetada. São exemplos destes vírus o vírus da rubéola e o vírus do dengue.

O vírus de cadeia negativa são aqueles cujo RNA genômico apresenta uma sequência de bases nitrogenadas complementares às dos do mRNA formados. Na célula hospedeira, a molécula de RNA viral também chamada de cadeia negativa serve de modelo para a

síntese de moléculas de RNA complementares de cadeia positiva. Algumas dessas moléculas de cadeia positiva atuam diretamente como mRNA na síntese de proteínas virais e outras moléculas que funcionam como modelo na síntese de cadeia negativa, as quais constituirão o genoma dos novos vírus formados na célula infetada. Exemplos deste tipo de vírus são os hantavírus, que causam febre hemorrágica, e o vírus da gripe. Estes vírus são arredondados, mas podem ser filamentosos, com invólucro e têm cerca de 80 a 120 nm de diâmetro (Lopes e Rosso, 2010).

Os vírus de RNA que são retrovírus contêm uma cadeia simples de RNA associada à enzima transcriptase reversa. A enzima transcriptase reversa é uma enzima que produz DNA tendo como modelo o RNA viral. Esta enzima faz a transcrição reversa, contrariamente ao que normalmente acontece nas células, onde o RNA é produzido a partir de um DNA que lhe serve de modelo. À medida que sintetiza o DNA, a transcriptase reversa degrada o RNA modelo. Em seguida, a enzima produz uma cadeia de DNA complementar à que foi copiada da RNA viral, originando uma molécula de DNA de cadeia dupla. Esse DNA será utilizado para transcrever moléculas de RNA que atuam como mensageiras na síntese das proteínas virais. O DNA produzido pela transcriptase reversa sintetiza também o RNA que constituirá o genoma dos novos vírus formados na célula infetada.

Esta família de vírus inclui os seguintes géneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* (como por exemplo o HIV) e *Spumavirus*. Nas últimas décadas, a família dos retrovírus têm sido um dos principais alvos de estudo dos cientistas por serem a causa de doenças graves em humanos, tais como, a síndrome da imunodeficiência adquirida. (Tenório *et al.*, 2008).

1.3. Nomenclatura Viral

As regras de nomenclatura viral são ditadas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) e não segue a taxonómica binominal de Lineu. A classificação viral

inicia-se por ordem e os nomes de ordens, famílias, subfamílias, géneros e espécies são escritos em itálico e com a primeira letra maiúscula. Os nomes ainda não reconhecidos aparecem entre aspa, em tipo comum, tabela 1.

O ICTV reconhece sete ordens, nomeadamente, *Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Ligamenvirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales* e a *Tymovirales*

De um modo geral, a ordem *Caudovirales* inclui os bacteriófagos, *Herpesvirales* é uma ordem de vírus em que todos partilham a mesma morfologia geral, na ordem *Ligamenvirales* incluem-se vírus lineares que infetam Archaea do Reino Crenarchaeota a ordem *Mononegavirales* inclui os vírus que infetam plantas e animais, a ordem *Nidovirales* inclui os vírus hospedeiros de vertebrados, na ordem *Picornavirales* os vírus tem como hospedeiros vertebrados, insetos e plantas e a ordem *Tymovirales* consiste me vírus com genoma formado por RNA de cadeia simples positiva sem intermediários de DNA e o seu material genético esta protegido por uma proteína especial de revestimento.

Segundo o ICTV atualmente são reconhecidas 104 famílias, 23 subfamílias, 505 géneros e 3186 espécies (ICTV).

Tabela 1. Regras de nomenclatura para a classificação dos vírus.

Classificação	Sufixo	Exemplo
Ordem	-virales	Nidovirales
Família	-viridae	Retroviridae
Subfamília	-inae	Orthoretrovirinae
Género	-virus	Lentivirus
Espécie	vírus	Human Immunodeficiency virus 1
Acrónimo		HIV-1
Nome comum		Vírus da SIDA

Os critérios utilizados para a classificação dos vírus são respetivamente: o hospedeiro parasitado, a morfologia do vírus e o tipo de ácido nucleico que estes têm. Também podem ser usados outros critérios na classificação viral, tais como: as características físico-químicas, as proteínas virais, as propriedades antigénicas, as propriedades biológicas, entre outras. A morfologia da partícula viral inclui o estudo do tamanho, da forma, do tipo de simetria, da presença ou ausência de espículas e a presença ou ausência de invólucro. As propriedades do genoma incluem o estudo do tipo de ácido nucleico, do tamanho do genoma, do número de cadeias (simples ou dupla), linear ou circular, sentido/polaridade (positivo, negativo, ou com ambos os sentidos), dos segmentos (número e tamanho), da sequência de nucleotídeos e conteúdo de guanina e citosina. As propriedades físico-químicas incluem o estudo da massa molecular, da densidade de flutuação, da estabilidade em pH, da termoestabilidade e da suscetibilidade a agentes químicos e físicos. As propriedades das proteínas inclui o estudo do número, do tamanho e das atividades funcionais das proteínas estruturais e não estruturais, da sequência de nucleotídeos, modificações (glicosilação, fosforilação, miristilação) e as atividades funcionais especiais, como transcriptase, a transcriptase reversa, a neurominidase e a atividades de fusão. A organização e replicação do genoma inclui o estudo da ordem do genoma, do número e posição das estruturas de leitura abertas, das estratégias de replicação, dos locais celulares de acumulação das proteínas e da organização e liberação do virião. Já as propriedades biológicas incluem o estudo da variedade de hospedeiros naturais, do modo de transmissão, da relação com vetores, patogenicidade, do tropismo tecidual e da patologia.

Cada um destes critérios contém informações diferenciadas para os diversos vírus o que facilita a identificação do vírus (Lopes e Rosso, 2010).

2. Evolução

A alimentação, as espécies predadoras e os agentes infecciosos desempenham funções importantes na evolução das espécies, nomeadamente a humana. Os vírus ocupam uma

posição estratégica na evolução dos seus hospedeiros devido á sua capacidade de atuar como parasitas genéticos moleculares. A luta contra as doenças infecciosas tem sido considerada um importante processo evolutivo. Se um parasita provoca a mortalidade do hospedeiro ou diminui a sua fertilidade pode ser considerado um agente seletivo. A maioria das espécies apresenta diversidade genética na produção de anticorpos que atuam na resistência às doenças. Considerando-se que em geral os agentes patogénicos se desenvolvem mais rapidamente que as defesas do hospedeiro, é interessante que o hospedeiro possua diversidade genética e elevada taxa de mutação nos genes relacionados à resistência a doenças (Van Blerkon, 2003).

Os vírus podem afetar a evolução dos seus hospedeiros, interagindo diretamente com o DNA do hospedeiro. Devido a sua simplicidade estrutural e sua dependência da maquinaria de replicação e transcrição da célula hospedeira, os vírus atuam como parasitas genéticos moleculares, podendo alterar o genoma do hospedeiro. O genoma de quase todos os vírus de DNA é constituído por DNA semelhante ao genoma das células do hospedeiro. Esta similaridade a nível da estrutura e da replicação favorece a integração do vírus com o genoma do hospedeiro, podendo esta integração ser feita a nível dos gametas e assim o novo código genético ser passado à próxima geração como se fosse uma característica mendeliana.

Comparados com os vírus de RNA, os vírus de DNA tendem a infetar tipos específicos de células de uma única espécie hospedeira. Muitos vírus de DNA provocam infeções crónicas e latentes no hospedeiros por longos período de inatividade do vírus mantendo-se no hospedeiro em pequenas populações por períodos prolongados. Os vírus de DNA tendem, portanto, a ser mais estáveis que os vírus de RNA. Provavelmente os primeiros homínídeos transportaram vários tipos de vírus de DNA, que se diversificaram e migraram com a população humana. As filogenias desses grupos de vírus coincidem com as relações evolutivas dos seus hospedeiros primatas, indicando um padrão de coevolução (Van Blerkon, 2003; Villarreal, 2007).

O genoma de aproximadamente 70% dos vírus que infetam animais apresenta-se na forma de RNA. O processo de replicação desses vírus apresenta em relação aos virus de

DNA erros maiores, com elevadas taxas de substituição de nucleotídeos. Assim sendo, os vírus de RNA possuem uma taxa de mutação maior, o que lhes confere a capacidade de se adaptar a novos hospedeiros e de aumentar a sua virulência. Geralmente, os vírus de RNA são menos específicos em relação ao hospedeiro que os vírus de DNA e podem transmitir-se facilmente entre diferentes espécies animais. Apesar de alguns vírus de RNA causarem infecções inaparentes nos hospedeiros os seus reservatórios naturais, a maioria realiza ciclos contínuos de replicação e produção de novos vírus, que afetam o hospedeiro (Van Blerkon, 2003).

Considerando o seu potencial para a transmissão entre espécies e evolução rápida, muitos vírus de RNA humanos foram adquiridos a partir de outras espécies, especialmente animais domesticados e roedores transportadores de doenças atraídos pela adoção do estilo vida nómada, desde o Neolítico, embora seja necessário ter cuidado concluindo este argumento, uma vez que a transmissão interespecies tem ocorrido frequentemente na direção inversa. (Van Blerkon, 2003).

Uma vez que o processo transcrição reversa carece da fase de revisão da replicação do DNA, um retrovírus sofre mutações muito frequentemente. Após integração no genoma hospedeiro, estes vírus escapam à deteção pelo sistema imunológico, tornando-se semelhantes aos vírus de DNA. O vírus da imunodeficiência humana apresenta populações geneticamente diversas com taxas de mutação mais rápidas.

Os *provírus* integrados ao genoma do hospedeiro, conhecidos como retrovírus endógenos e que perderam a capacidade de produzir partículas infecciosas têm as sequências nucleotídicas multiplicadas e inseridas em vários pontos do genoma do hospedeiro. Estima-se que 8% do genoma humano seja constituído por sequências de retrovírus endógenos. Assim sendo, os retrovírus endógenos humanos podem ter contribuído diretamente na expressão génica do hospedeiro e participado do processo evolutivo humano (Van Blerkon, 2003).

2.1. A Coevolução do Vírus e o Hospedeiro

Durante a evolução, os vírus e os respetivos hospedeiros desenvolveram mecanismos complementares quer de ataque por parte do vírus quer de defesa por parte do hospedeiro. Assim sendo, o fenótipo de resistência ou de suscetibilidade dos hospedeiros à infeção viral depende do equilíbrio entre estes mecanismos. Ou seja, os vírus ao invadirem um organismo/hospedeiro desencadeiam pressões seletivas no hospedeiro, moldando as características da célula hospedeira, favorecendo a replicação viral e alterando as funções celulares normais. Em contrapartida o processo de adaptação do hospedeiro à entrada do vírus também exerce uma pressão seletiva sobre o vírus que desencadeia um processo de contra-adaptação. Assim, ao longo da evolução do vírus e do hospedeiro, estes procuram o equilíbrio da relação hospede/hospedeiro (Villarreal, 2007).

Quando o sistema entra em desequilíbrio, a célula hospedeira pode sofrer alterações nas suas funções celulares ou ocorrer a morte celular, provocando o desenvolvimento da doença associada ao vírus, figura 10.

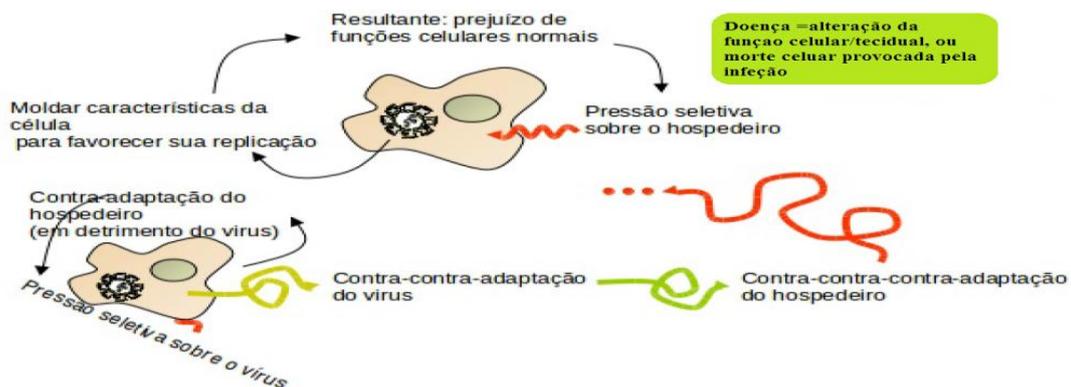


Figura 10. Esquema representativo do processo de coevolução do vírus no hospedeiro. (Adaptado de Lopes e Rosso, 2010).

Atualmente considera-se que a coevolução de parasitas e hospedeiros resulta da atenuação da virulência dos parasitas e do comensalismo. Os hospedeiros e os parasitas no curso da evolução adaptam-se uns aos outros, chegando a um estado de equilíbrio, de

tolerância mútua, quase perfeita. A associação parasita-hospedeiro deve permitir que ambos vivam e propaguem a espécie. Quando tal não acontece ocorre um parasitismo mal ajustado (Martins, 1982). Por outro lado, o parasita não pode existir sem o seu hospedeiro, assim sendo, não há vantagens para o parasita em destruir o seu hospedeiro. Estes mecanismos de simbiose podem ser vistos como o resultado evolutivo das associações parasitárias (Trager, 1988). As espécies interdependentes podem sofrer coevolução e coadaptação com a redução da virulência. Considera-se que a virulência é um sinal de falta de adaptação do parasita e os parasitas pouco virulentos são um indicativo da prolongada associação ao hospedeiro, que resultou na redução gradual da virulência (Dobzansky, 1973).

A mixomatose é uma doença vírica que ocorre naturalmente em coelhos (*Sylvilagus brasiliensis*) na América do Sul, provocando uma infeção benigna (pequenos tumores e mortalidade muito baixa). Já nos coelhos europeus e australianos esse vírus provoca doença letal com lesões graves. Na década de cinquenta a população de coelhos na Austrália (*Orytolagus cuniculusera*) rondava as centenas de milhões. Assim, como medida de controlo populacional introduziu-se o vírus da mixomatose no país. Após a dispersão do vírus a população de coelhos foi reduzida em cerca de 1 % da população inicial. Este exemplo sugere que nas associações mais antigas os parasitas sofrem pressão seletiva resultando em virulência atenuada (Ebert, 1994).

Apesar de esta doença ser a responsável pela diminuição drástica da população de coelhos na Austrália, surgiram formas menos virulentas do vírus e os coelhos apresentam maior resistência à infeção (Fenner e Ratcliffe, 1966).

Estudos laboratoriais com linhagens de coelhos de laboratório mostraram que após a introdução do vírus com grau I de virulência (altamente virulento), formas menos virulentas surgiram com a predominância de vírus com grau médio de patogenicidade (III-IV). Em relação ao grau de resistência da população de coelhos à infeção verificou-se a presença de vários graus de resistência predominando a virulência intermedia. Face a estes resultados pode-se inferir que no caso do vírus da mixomatose na Austrália, a

virulência intermediária pode resultar da coevolução entre parasita e hospedeiro (Fenner e Ratcliffe, 1966; Trager, 1986).

Esta conceção apesar de genericamente estar correta, os vírus podem evoluir no sentido de aumentar a virulência se isso lhes trazer vantagens de sobrevivência e transmissão, pelo que contradizendo esta visão tradicional, os resultados obtidos para a infeção de crustáceos *Daphnia magna* na Inglaterra, Alemanha e Rússia com o protozoário da estirpe da Inglaterra mostraram que o crustáceo da Inglaterra era o que apresentava maior número de esporos ou seja maior infeção em comparação com as populações de hospedeiros das outras regiões da Europa. Este resultado confirma que a hipótese de que o grau de virulência é determinado pela seleção natural para maximizar a transmissão do parasita e não um indicativo da antiguidade da relação parasita-hospedeiro (Fenner e Ratcliffe, 1966; Trager, 1986).

2.2. Importância das Vias de Transmissão

Alguns autores interpretaram os dados epidemiológicos das diferentes doenças comparando-os com as vias de transmissão, as taxas de virulência e o comportamento do hospedeiro. Da análise desses estudos concluíram que a virulência de parasitas transmitidos por vetores artrópodes é maior que aquela de parasitas transmitidos por outras vias, de ressaltar que doenças como tuberculose, raiva e SIDA, não transmitidas por vetores artrópodes, não foram alvo de estudo, pois a inclusão destas pode alterar os resultados e as conclusões dos autores (Ewald, 1983; Ewald, 1987; Ewald. e Schubert, 1989; Ewald, 1993).

Segundo os estudos, a gravidade das doenças associadas com transmissão por vetores resulta em parte da adaptação do parasita ao hospedeiro. Os agentes infecciosos transmitidos por vetores biológicos, tais como, insetos hematófagos, com virulência relativamente alta e que se disseminem pelos vários tecidos do hospedeiro terão uma probabilidade maior de se multiplicar. Isso aconteceria porque o hospedeiro debilitado e

imóvel tem maior probabilidade de ser picado pelos insetos, facilitando a transmissão do parasita para outros indivíduos. A gravidade de doenças tais como a febre-amarela, tripanossomíase africana e malária poderia ser explicada como uma consequência evolucionária da transmissão de parasitas por vetores biológicos (Ewald, 1983).

Um exemplo da relação entre virulência, comportamento do hospedeiro e transmissão direta é o comportamento do *rinovírus* causador da constipação que infecta as células das vias respiratórias superiores. Estes vírus são libertados em aerossóis, quer por espirros quer por expetoração, podendo o vírus ser transmitido a outros indivíduos. No entanto, se, devido a doença, o hospedeiro ficar imóvel, milhares de vírus libertados diariamente ficarão sem contaminar outros indivíduos. Portanto, há vantagens evolutivas para o rinovírus manter o seu hospedeiro em movimento, e para tal, é necessário não o debilitar ao extremo, isto é, não ser altamente virulento (Ewald, 1993; Giorgio, 1994).

As doenças transmitidas através da água, refletem o comportamento do hospedeiro e as condições ambientais e preveem que os parasitas sejam mais virulentos que aqueles transmitidos pelo contato direto. Uma população grande e altamente virulenta de vírus terá maior facilidade em ultrapassar o efeito da diluição na água e tal como os parasitas transmitidos por insetos terão "vantagens evolutivas na imobilização de seus hospedeiros. A gravidade das doenças como a febre tifoide, a cólera e outras formas de disenteria, podem ser explicadas como resultado da transmissão do parasita através da água. Durante os surtos diarreicos provocados por bactérias patogénicas, os indivíduos podem contaminar as roupas, assim, se as condições sanitárias forem precárias, a água utilizada para lavagens dessas roupas pode entrar em contato com outros indivíduos transmitindo o parasita. Nesse caso, um doente imobilizado terá mais facilidade de infectar mais hospedeiros. Os vírus entéricos humanos são importantes causas de enfermidades veiculadas através da água. Esses patógenos, que são eliminados em grandes quantidades pelas fezes de indivíduos infetados, podem permanecer viáveis e infecciosos durante vários meses no ambiente e, assim, contaminar águas destinadas ao consumo humano, além de resistirem aos atuais processos de tratamento da água (Ewald, 1993; Tavares, 2005).

A introdução de mecanismos de tratamento de água e de instalações sanitárias reduziria a virulência dos parasitas transmitidos pela água, pois estes não teriam vantagens evolutivas em se reproduzirem. Os dados obtidos na Índia, nas décadas de cinquenta e sessenta, após medidas de saneamento básico em áreas endémicas de cólera, demonstram esta hipótese, pois o agente da cólera com virulência mais atenuada (*Vibrio cholerae*, El Tor) predominou em relação à forma mais virulenta, provavelmente devido a sua menor patogenicidade e também a sua capacidade maior de sobrevivência. Em vários países a bactéria *Shigella dysenteriae* (a mais virulenta do seu género) foi praticamente eliminada após tratamento de água, e a espécie predominante tornou-se a *S.flexneri* (com virulência moderada) (Ewald, 1993; Tavares, 2005).

2.3. Os vírus e a Evolução das Espécies

As três grandes classes de hipóteses para a origem dos vírus são defendidas na literatura (Claverie, 2006; Forterre, 2006; Wessner, 2010):

- i. A hipótese do vírus primeiro foi revivida na última década por Wolfram Zillig que sugeriu que os vírus foram originados no mundo pré-biótico, usando a sopa primitiva como hospedeiro. Tal hipótese está em linha com a visão, adotada por vários biólogos moleculares, em que a formação das células ocorreu relativamente tarde na evolução da vida.
- ii. A hipótese do escape é uma hipótese tradicional que vê os vírus como elementos do genoma de uma célula que escaparam do seu ambiente celular, transformando-se em elementos genéticos autónomos e invejosos infecciosos, é uma hipótese mais fácil de defender num cenário pré LUCA para a origem dos vírus. Estes genomas podem ter sido constituídos por cromossomas semiautónomos (possivelmente formados por uma pequena quantidade de genes de RNA) que foram replicados independentemente e transferidos aleatoriamente entre as células. Alguns cromossomas de RNA poderiam codificar proteínas de revestimento que ajudariam o proto vírus no processo de transferência, finalmente tornando-se infeccioso.

- iii. A hipótese da redução sugere que a transformação de um organismo celular num vírus pode ter sido muito mais fácil num mundo de células de RNA, uma vez que estas células eram muito mais simples que as células modernas. Tal como um parasita moderno pode perder parte dos seus canais metabólicos, uma célula de RNA vivendo como um parasita endosimbionte em outra célula de RNA pode ter perdido a sua própria maquinaria para a síntese proteica e produção de energia, usando em vez destes, a maquinaria do hospedeiro.

Segundo Forterre (2006) os vírus de RNA tiveram origem no Mundo das nucleoproteínas a partir da fuga ou redução de organismos celulares. Enquanto os vírus de DNA eram originados diretamente de vírus de RNA. Este autor descarta a hipótese da coevolução uma vez que os vírus atuais, incluindo viroides (moléculas infecciosas de RNA sem cápside), são parasitas intracelulares. Por outro lado os vírus são dependentes de ribossomas para se reproduzirem já os viroides necessitam de um ambiente que forneça os nucleotídeos. Na opinião do autor, tais condições dificilmente ocorreriam num ambiente com moléculas livres na solução. Mas os vírus seriam de origem antiga e não resultado de reduções mais recentes pelo fato de as proteínas de transcrição, replicação, recombinação e reparo (proteínas informacionais) serem diferentes na sequência em relação às proteínas que desempenham o mesmo papel nos seus hospedeiros (Forterre, 2006).

Koonin *et al.* (2006) defendem a hipótese do vírus primeiro. Segundo os autores, os diferentes grupos de vírus compartilham um conjunto de genes que sugerem o monofilietismo e apenas distantemente relacionados com genes presentes nos organismos celulares, os "genes de marca virótica" (*viral hallmark genes*). Existem duas proteínas virais, não compartilhadas com organismos celulares, que estão presentes nos diferentes grupos de vírus (embora não em todos os membros de cada grupo): a proteína de topologia de rocambole, "*jelly-roll protein*" e as helicases da superfamília 3 (S3H). O fato de esses genes de origem vírica serem em número reduzido, estando presentes entre os membros dos diferentes grupos de vírus indicaria que os vírus não seriam um grupo monofilético; por outro lado, estes não são originários de compartilhamento por transferência horizontal face à grande divergência na sequência dos genes entre os

diferentes grupos de vírus. Assim, seriam originários diretamente da mistura de genes que antecedessem a emergência das células (Koonin *et al.*,2006).

Normalmente é considerado que o RNA foi “logicamente” substituído pelo DNA no decorrer da evolução por duas razões: primeira é mais estável, graças à remoção do oxigénio reativo na posição 2' da ribose, e segunda a modificação na mensagem genética produzida por desaminação da citosina em uracilo (uma reação química espontânea comum) pode ser reconhecida e reparada no DNA ao contrario do RNA. Como consequência desta estabilidade, e mais fiável replicação, a substituição do RNA pelo DNA como material genético celular permitiu um aumento no tamanho do genoma, células com genomas maiores de DNA tornaram-se mais complexas, ultrapassando os seus ancestrais com genoma baseado em RNA (Lazcano *et al.*,1988). No entanto, estas argumentações não podem explicar totalmente a origem do DNA, desde a evolução do sistema de reparação do DNA removendo uracilo do DNA, e, de um modo mais geral, a vantagem de ter uma genoma maior pode ter sido um fator determinante no processo de evolução apenas depois da população de células de DNA estar estabelecida. E se em vez disso, a substituição do RNA por DNA ocorreu primeiro nos vírus, a modificação do seu genoma de RNA em DNA teria produzido um benefício imediato para os vírus (um pré-requisito para a seleção darwinista). Nos sabemos que alguns vírus modernos alteram de fato quimicamente o seu genoma de DNA para se tornarem resistentes às nucleases do seu hospedeiro (por exemplo por via de metilação, hidroximetilação ou processos químicos mais complexos de modificação)(Forterre, 2006). Como primeiro passo, o surgimento ou recrutamento da redutase ribinucleotida activa ancestral no vírus, iria modificar o genoma de RNA em genoma de DNA contendo uracilo (U-DNA). Este passo intermedio na transição de RNA para DNA é inferido da síntese de dTMP a partir de dUMP em células modernas. Alguns vírus de bactérias que têm genomas de U-DNA podem ser relíquias desta primeira transição (Forterre, 2006). Vírus que conservaram um genoma de RNA evoluíram mecanismos alternativos para proteger o seu material genético contra a degradação do RNA ou modificando enzimas, sendo que alguns deles mantêm o seu genoma de RNA nas suas capsides durante todo o processo de infeção, enquanto outros conseguem codificar proteínas que inibem a degradação celular do RNA ou modificam mecanismos responsáveis pela degradação do RNA (ex: desmetilases). No segundo passo, o

surgimento de atividade de timidilato sintase em alguns vírus de linhagem U-DNA terá produzido vírus com a forma moderna de DNA contendo timidina T-DNA. Este passo terá ocorrido de forma independente pelo menos duas vezes de modo a explicar a existência de duas timidilato sintase não homologas, ThyA e ThyX (Myllykallio et al.,2002). Em concordância com a ideia que a ribonucleótido redutase e a timidilato sintase foram inventadas na virosfera , é importante notar que muitos vírus de DNA são capazes de codificar o seu próprio ribonucleótido redutase ou a sua timidilato sintase. Além disso, estas proteínas estão normalmente apenas relacionadas distantemente com aquelas codificadas pelos seus hospedeiros na árvore filogenética(Myllykallio et al.,2002; Filée et al.,2003;Miller et al.,2003;Forterre et al.,2004).

No entanto em conformidade com Koonin *et al.* (2006) a hipótese do ancestral celular com genoma de RNA não seria possível pelo fato de o conjunto mínimo de genes necessários para uma célula funcional ser relativamente grande da ordem de algumas centenas. A instabilidade das moléculas de RNA exigiria que tal genoma consistisse em moléculas distintas de RNA e que fossem o suficiente pequenas para garantir uma replicação. Isso, porém, levantaria a uma questão de como as células filhas receberiam pelo menos uma cópia de cada molécula, para tal, seria necessário um sistema altamente aperfeiçoado de segregação de moléculas de RNA. Além disso, se o sistema de produção do DNA das células tivesse sido recrutado a partir dos vírus, seria de se esperar que os genes de origem vírica essenciais à replicação do DNA como os S3H e a primase do tipo vírico estivessem presentes. Para os autores, tanto as células quanto os vírus de DNA seriam descendentes de um mundo de DNA que sucedeu o mundo de RNA em etapas intermediárias. Para este autor, o modelo da evolução dos sistemas genéticos envolve a replicação e a competição de moléculas em soluções contidas em compartimentos inorgânicos intercomunicantes (como poros de uma rocha), assim:

a) do Mundo de RNA teriam surgido as enzimas do RNA, as ribozimas egoístas que dariam origem aos intrões do tipo I;

b) do Mundo de RNA- surgiriam as proteínas dos vírus de RNA de cadeia dupla;

c) do Mundo de RNA-DNA- os retrotranscriptase, os exões, e os intrões do tipo II;

d) do Mundo de DNA, as células bacterianas, a Arquea e os vírus de DNA.

A evolução dos cápsides teria ocorrido já nas fases pré-celulares promovendo, o transporte entre os compartimentos e a proteção do material genético dos ancestrais dos vírus. Durante a evolução até à célula o sistema genético teria características virais, cada molécula de RNA e DNA atuariam como elementos genéticos egoístas, não havendo distinção entre elementos parasitas daqueles que dariam origem aos genomas das formas celulares. Essa distinção ocorreria com o desenvolvimento de cooperativas egoístas, conjunto relativamente estável de elementos genéticos co-herdados. Num estágio posterior, os genes codificadores de elementos de replicação e os genes de funções acessórias passariam a ficar fisicamente ligados; enquanto genes solitários ocupariam o nicho parasítico. Os vírus eucarióticos surgiriam da mistura de vírus bacterianos com vírus de Arquea enquanto a célula eucariótica surgiria da fusão de uma bactéria com Arquea. A hipótese da fusão é defendida por Koonin *et al.* (2006) pelo fato de o genoma eucariótico apresentar similaridades com genoma Arquea e de bactérias.

Forterre (2006) defende ainda a hipótese da eucariogénese viral, isto é, os vírus seriam os responsáveis pela emergência do núcleo eucariótico. Os Poxvírus têm um ciclo reprodutivo remanescente a características do núcleo eucariótico. A polimerase de DNA e as enzimas de *capping* de RNAm do Poxvírus estão evolutivamente relacionadas com as dos eucariotas (embora formem um grupo monofilético viral). A transcrição inicial do DNA viral ocorre ainda no núcleo viral e o RNA resultante é passado ao citoplasma do hospedeiro por meio de poros. Depois da liberação do núcleo viral, o DNA do vírus organiza-se segundo um mininúcleo, recrutando a membrana do retículo endoplasmático do hospedeiro. A replicação do DNA do vírus só se realiza após a formação do mininúcleo que desaparece após término da replicação viral num processo controlado por proteínas fosforilantes. Embora Poxvírus tenham um genoma pequeno, os mimivírus têm um genoma (cerca de 1Mb), o que é metade do tamanho dos menores genomas eucariotas. Assim um vírus de DNA poderia ser um iniciador da eucariogénese (Forterre, 2006).

A hipótese que o DNA foi transferido dos vírus para as células, juntamente com toda a maquinaria necessária para a sua replicação, foi originalmente proposta para explicar a existência de duas combinações de proteínas replicadores do DNA não homologas, umas no domínio Bacteria, e o outro conjunto em Archaea e Eucarya. Foi então necessário conceber que ocorreram pelo duas transferências independentes para ter em conta esta observação. Recentemente Forterre sugeriu que ocorreram três transferência de DNA independentes de vírus para células de RNA, o que levou à formação dos três domínios Archaea, Bacteria e Eucarya. A hipótese “três vírus três domínios” pode explicar porque a maioria da maquinaria de replicação em células Eucarya e Archaea, apesar de similar, exhibe diferenças críticas. Consequentemente, as principais topoisomerasas do DNA Eucarya (Topo IB e Topo IIA) não são filogeneticamente relacionadas com as das Archaea (Topo IA e Topo IIB) (Gadelle et al.,2003; Krogh e Shuman, 2002). Em adição, Archaea contem DNA polimerases da família D sem homólogos presentes em Eucarya. (Cann et al.,1998). Além disso, as DNA polimerases da família B em células Archaea e Eucarya, apesar de serem homologas, não estão especificamente relacionadas, mas ambas agrupam com diferentes grupos virais na filogenia das DNA polimerases B (Filée et al.,2003).

Esta hipótese pode também explicar o motivo pelo qual membros de diferentes domínios são infetados por grupos de vírus específicos. Se um ancestral de todos os vírus existentes presentemente já prospera-se no tempo de LUCA, membros de uma determinada família viral (por exemplo Fuselloviridae) deveriam ser capazes de infetar células dos três domínios celulares. E isto não é aparentemente o caso, uma vez que a presença de fuselloviridae aparenta ser restrita a células do domínio Archaea. Contudo, num cenário três vírus três domínios, seguindo uma diversificação inicial das linhagens virais paralelamente com a divergência nas linhagens de células de RNA, apenas vírus de eram capazes de infetar células de RNA no ponto de origem de cada domínio poderiam ter sobrevivido a massiva eliminação de células de RNA (e RNA/DNA vírus) que ocorreu após o surgimento das três linhagens de células de DNA. Isto teria selecionado em cada domínio uma subpopulação de diferentes famílias virais que estariam pré adaptadas para infetar as células de DNA recém formadas (Forterre, 2006).

Claverie (2006) também defende a eucariogénese viral, ocorrendo por transferência gradual do genoma de RNA do hospedeiro para o núcleo. Para Witzany, os telómeros são outra marca do processo de eucariogénese viral. Contudo, não se sabe se os telómeros nas bactérias com núcleos, os *Planctomyces*, são semelhante às dos eucariotas, apesar de fornecer um importante dado para a hipótese à eucariogénese viral (Witzany, 2008).

Forterre e Prangishvili (2009) apresentam uma outra hipótese para o envolvimento de vírus na eucariogénese. Em lugar da ação direta da infecção por um vírus gigante de DNA, a célula hospedeira de um protoeucariota teria recrutado os mecanismos virais produzindo a sua própria membrana e poros nucleares. Assim, num primeiro momento, esta célula teria protegido o seu material genético dos vírus. Por sua vez, a capacidade de formação do mininúcleo teria surgido quer nos vírus de DNA quer nos vírus de RNA protegendo-os do sistema de defesa do hospedeiro (Forterre e Prangishvili, 2009).

Assim, a complexa parede celular bacteriana poderia ter origem numa resposta à pressão seletiva para evitar os ataques virais já que esta é o principal modo de entrada do vírus por meio da fusão deste com a membrana celular. Isso explica a pequena diversidade viral entre as bactérias em comparação com os vírus de Arquea e eucariotas e a predominância de vírus *Caudovirales*. Uma vez que estes vírus desenvolveram um sistema de entrada com uma cauda proteica que penetra na parede e na membrana celulares e injeta o material genético para o interior da célula hospedeira. Por conseguinte, os autores sugerem que os mecanismos nos hospedeiros para evitar a infecção por parte dos vírus que poderiam ter conduzido à divergência entre os domínios e entre as espécies dentro de cada domínio, através de um efeito colateral na redução da transferência lateral de genes (Forterre e Prangishvili, 2009).

De acordo com Forterre (2006), os vírus têm um papel na evolução das mitocôndrias e dos cloroplastos. As mitocôndrias são derivadas de uma α -proteobactéria endossimbionte, mas a polimerase de RNA, a polimerase de DNA e a helicase codificadas no seu genoma são similares aos correspondentes elementos do bacteriófago T3/T7. As proteínas homólogas são codificadas pelo genoma de *provírus crípticos*

presentes em proteobactérias. Aparentemente houve uma substituição não homóloga na evolução do organelo. Já nos cloroplastos, as polimerases de RNA são similares quer às bacterianas (cianobactérias) quer às virais.

Nos eucariotas, tais como, nos mamíferos aproximadamente 30% do genoma consiste em sequências intrónicas, e 60% do genoma consiste em regiões intergénicas com elementos móveis em variados estados de degradação. Segundo Koonin *et al.* (2006), estes elementos móveis, são oriundos do “Mundo de Vírus” ancestral. Os vírus endógenos e retroelementos podem libertar-se de uma porção do genoma e inserirem-se em outra porção, alterando o padrão de expressão de genes. Por outro lado podem criar novos genes criando um novo sítio de edição – *splicing* - alternativo. (Forterre e Pragishvili, 2009).

Harris sugere que uma infeção viral na linhagem germinativa de um ancestral metatério pode ter impulsionado o desenvolvimento da placenta o que justificaria a presença de retrovírus endógenos no citotrofoblasto placentário. Os retrovírus são capazes de induzir a fusão celular tanto em tecidos cultivados quanto *in vivo*. Após o parto, com a expulsão da placenta, o sinciotrofoblasto exibe sinais de degeneração com aglomeração nuclear e picnose. Este padrão é idêntico ao sincício formando em células cultivada e infetadas com retrovírus, bem como em certos tumores e tecidos de organismos com infeção retroviral, figura 11.

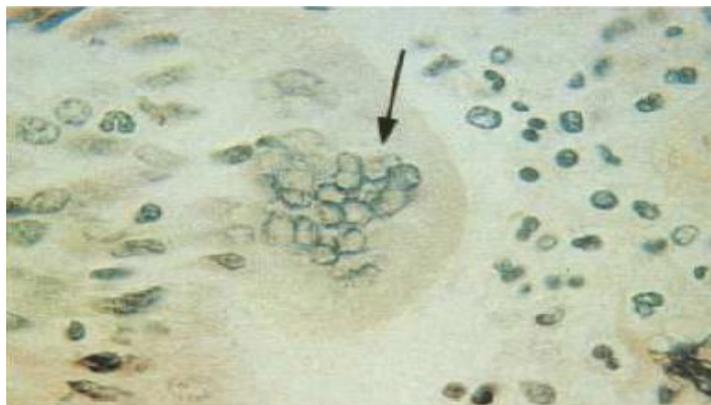


Figura 11. Sincício-fusão de várias células infetadas por um vírus (<http://cc04-10.med.up.pt>).

Na década de 1970, foram observadas, por microscopia eletrónica, partículas virais no sincitiotrofoblasto da placenta indicando a presença de um provírus. Os estudos posteriores confirmaram esta hipótese e foi identificada a sequência intacta de um gene viral derivado de retrovírus endógenos (HERVs), que produzem uma proteína do sincitiotrofoblasto, denominada de cincitina. Esta proteína está envolvida na fusão dos tecidos na interface mãe-feto e na supressão da resposta imunológica, garantindo a tolerância ao feto pelo sistema imune da mãe o que impede a rejeição do feto resolvendo o grande dilema da maternidade. A placenta surgiu ao longo da evolução dos mamíferos e exerce um papel crucial, permitindo a nutrição e a proteção do embrião nesse período (Sentís, 2002).

A principal diferença entre chimpanzés e o humano são o número, a variedade e, mais importante, os *locus* de integração de elementos de origem viral no genoma humano. A origem da humanidade poderá ser vista como resultado da criatividade viral (Villarreal, 2004).

3. Vírus como Vetores na Tecnologia do DNA Recombinante

Os eventos de mutação são responsáveis pela geração de variabilidade genética nas populações, permitindo a ação da seleção natural que favorece os tipos mais adaptados. A exploração dessa variabilidade pela espécie humana, embora de forma empírica, teve início há cerca de dez mil anos, quando se deu a domesticação das primeiras culturas agrícolas.

O melhoramento genético de plantas, animais ou microrganismos só é possível se existir variabilidade genética, isto é, se, dentro das espécies a serem melhoradas, ocorrerem indivíduos com diferentes características que podem ser herdadas. Essa variabilidade é facilmente constatada tanto na espécie humana como em qualquer outra. Tem origem, fundamentalmente, em mutações, que são a base da evolução. Resultam de modificações que ocorrem nas moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA), que é o

material genético de todos os seres vivos. O mecanismo de recombinação resultante da hibridação, ou seja, do cruzamento entre tipos portadores de diferentes mutações promove uma variabilidade adicional nas populações, propiciando a ocorrência do fenómeno de seleção natural (Azevedo *et al.*, 2000).

Na clonagem molecular, um fragmento do DNA de interesse liga-se a outra molécula de DNA chamada de vetor para formar um DNA recombinante.

Essa molécula de DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação. Para que possa ser usada como vetor, uma molécula de DNA deve ser capaz de se replicar dentro da célula hospedeira, além de ter um tamanho pequeno. É de grande importância a descrição de vetores moleculares para a propagação das moléculas de DNA inseridas e os vetores comumente empregados são plasmídeos bacterianos, bacteriófagos ou vírus animais e vegetais.

A palavra vetor, que deriva do Latim *vector* (aquele que carrega, entrega) define o agente que constitui ou contém os genes a serem transferidos e expressos em células recetoras.

A construção de uma molécula de DNA recombinante favorece o estudo da estrutura dos genes, no diagnóstico clínico, na terapia genética, no melhoramento animal e vegetal, na obtenção de grandes quantidades de proteínas raras e na construção de bibliotecas de genes.

O bacteriófago lambda, parasita obrigatório de *E. coli*, é um dos vetores de clonagem molecular mais utilizado na tecnologia do DNA recombinante. Durante o ciclo lítico do fago, os genes envolvidos no ciclo lisogénico, que são dispensáveis no ciclo lítico, podem ser totalmente substituídos por outro fragmento de DNA, melhorando em 100% a infecção da *E. coli* hospedeira.

Hoje há uma enorme quantidade de estudos que descrevem o potencial dos vírus como vetores de clonagem para células animais, recebendo especial atenção os vírus de

mamíferos tais como *Simian vírus 40* (SV40), o Adenovirus e o Baculovirus. O vírus SV40, isolado de células tumorais de macacos, foi um dos primeiros sistemas virais utilizados para introduzir genes em células de mamíferos.

Vetores virais tem sido usados na terapia genética, a fim de levarem o DNA terapêutico ao núcleo das células alvo. Atualmente há cinco grupos principais de vetores virais usados: retrovirais, lentivírus, adenovírus, virais adenoassociados e virais de herpes simplex.

Todos apresentando vantagens e desvantagens. Um retrovírus murino, o vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV), foi o primeiro sistema vetorial desenvolvido para aplicações clínicas da terapia genética. Os vetores adenovírus são os vetores de DNA mais utilizados, mas não se integram no genoma e são imunogênicos (de Azevedo et al., 2000).

3.1. Terapia Genética

Os bacteriófagos foram descobertos na época da Primeira Guerra Mundial e logo se tornaram uma esperança na prevenção ou cura de doenças infecciosas. A terapia com recurso a bacteriófagos já era estudada em 1915, como base para o tratamento de infecções. Mas com o advento dos antibióticos na década de 40, as pesquisas com esses vírus foram interrompidas, ressurgindo apenas nos últimos anos, decorrente ao aparecimento de linhagens resistentes aos antibióticos, associadas ao elevado uso destas moléculas (Menck, e Ventura, 2007).

Em 1944 Avery Oswald e seus colaboradores demonstraram que era possível transferir genes de uma estirpe bacteriana patogénica para outra não-patogénica, identificando o DNA como portador da informação genética. Esta descoberta permitiu a James Watson e Francis Crick em 1953 propor a estrutura da dupla-hélice do DNA. Só no ano de 1964

Edward L. Tatum, Joshua Lederberg e Arthur Kornberg, prêmios Nobel da medicina, especularam a possibilidade transferir genes (Menck, e Ventura, 2007).

O isolamento do primeiro gene ocorre no ano de 1969 por Jon Beckwith e colaboradores em Harvard reforçando a possibilidade da transferência genética. No entanto, teve início também a polêmica acerca da segurança da engenharia genética e a possibilidades da sua utilização para eugenia. Este debate estendeu-se durante a década de 70 e resultou na criação de legislação em diversos países sobre o assunto (Menck, e Ventura, 2007).

Em 1977, os pesquisadores Michael Wigler e Richard Axel conseguiram inserir o gene que codifica a enzima timidina quinase em células portadoras de deficiência nesse gene. A metodologia utilizada ainda era pouco eficiente e só ganhou força com a proposta de utilizar vírus não-patogênicos como vetores transportadores de genes. Esta ideia impulsionou os estudos na área e já nos anos de 1983 e 1984 foram propostos os primeiros sistemas de vetores derivados de três espécies virais, o retrovírus, o adenovírus e os vírus adenoassociados (AAV), figura 12.

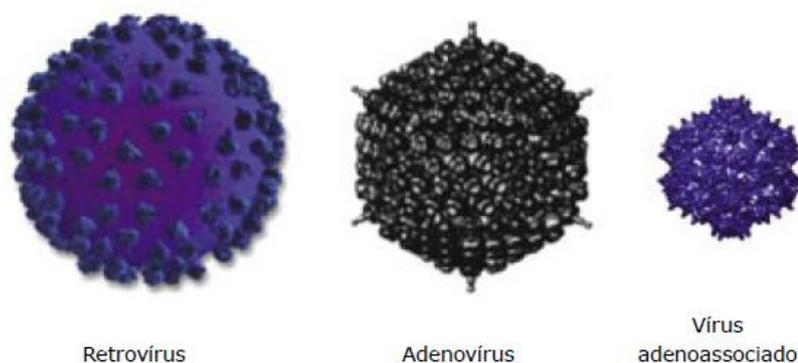


Figura 12. Principais vírus usados como vetores na terapia genética (<http://www.usp.br/aun/index.php>).

A possibilidade de usar os vírus como veículos para transportar e introduzir genes num paciente, permitindo a cura de doenças abre enormes perspectivas na área da saúde. Esta terapia pretende utilizar as estratégias dos vírus, que ao longo da evolução por milhões de anos aperfeiçoaram a capacidade de transferir material genético para células de um indivíduo resultando em benefício terapêutico (Menck, e Ventura, 2007).

A capacidade de interferir na constituição genética de um indivíduo, por meio da terapia génica, surge como uma nova esperança para os problemas relacionados com a saúde humana, permitindo a cura de doenças genéticas herdadas dos pais, ou mesmo de doenças que podem ser adquiridas durante a vida, como o cancro, doenças cardiovasculares e infeções virais.

Mas afinal o que é a terapia génica. A terapia genética envolve qualquer estratégia de introdução de uma informação genética numa célula com o intuito de modificar o curso de uma doença.

A teoria por trás da terapia genética é bastante simples, apesar de sua prática ser bastante mais complexa. O objetivo da terapia genética é proporcionar às células as ferramentas necessárias para combater uma dada doença. Por exemplo, a hemofilia é causada por uma mutação genética herdada num gene que regula a coagulação sanguínea. Através da transferência de uma cópia saudável desse gene para o doente, as células deste doente podem produzir a proteína que estava ausente e, assim, regular a coagulação de forma apropriada. Esta terapia funciona de uma forma diferente em relação aos fármacos tradicionais, os quais não corrigem a origem da doença mas apenas tratam dos sintomas da doença. Com a terapia genética, em teoria, uma doença herdada pode ser tratada na sua origem genética e o doente pode ter uma vida normal sem a necessidade de medicamentos adicionais (Menck, e Ventura, 2007).

Quando falamos de “transferência génica” não estamos a ser precisos no uso do termo pois o que realmente está a ser transferido é, na maioria das vezes, um cDNA. O cDNA é um derivado do mRNA e que contém todas as informações necessárias para produzir uma proteína de uma forma compacta e simplificada. No entanto, a introdução do cDNA numa célula não garante a produção da proteína são necessárias as informações

que regulam o processo de transcrição e tradução, ou seja, como, onde e quanto de proteína terá que ser produzida. Assim, o cDNA tem que ser acompanhado de sequências de DNA extras, ditas sequências regulatórias, que são importantes para controlar todo o processo (Menck, e Ventura, 2007).

A introdução destes elementos regulatórios junto ao cDNA permite manipular e regular a produção da proteína de interesse para que esteja disponível na célula certa, no tempo certo e na quantidade certa.

Isto é feito através da utilização de promotores (sequencia regulatória) que produzem a expressão do cDNA para tecidos específicos (como por exemplo células tumorais) ou em condições fisiológicas pré-determinadas (células em divisão acelerada como em alguns tipos de cancro).

Genericamente e de uma forma simplificada, as etapas envolvidas na de terapia genética são: o isolamento do gene, a construção de um vetor, a transferência para células no tecido alvo, e a produção da proteína codificada e expressa pelo gene terapêutico nessas células, segundo a figura 13.

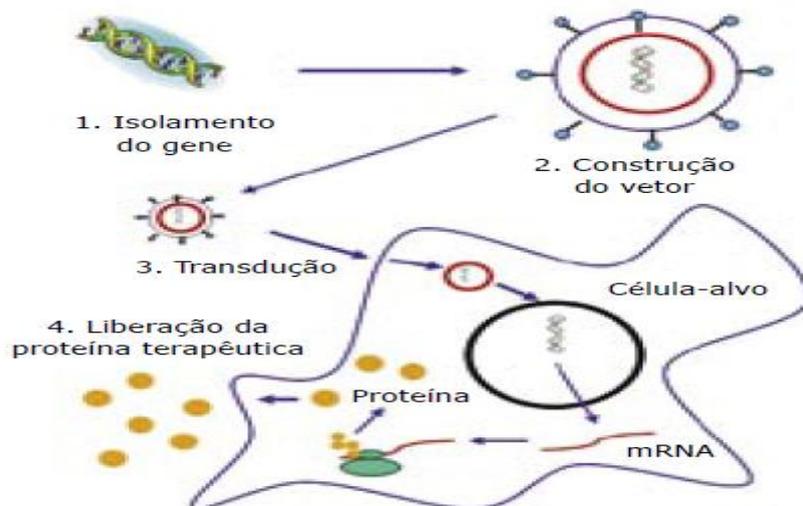
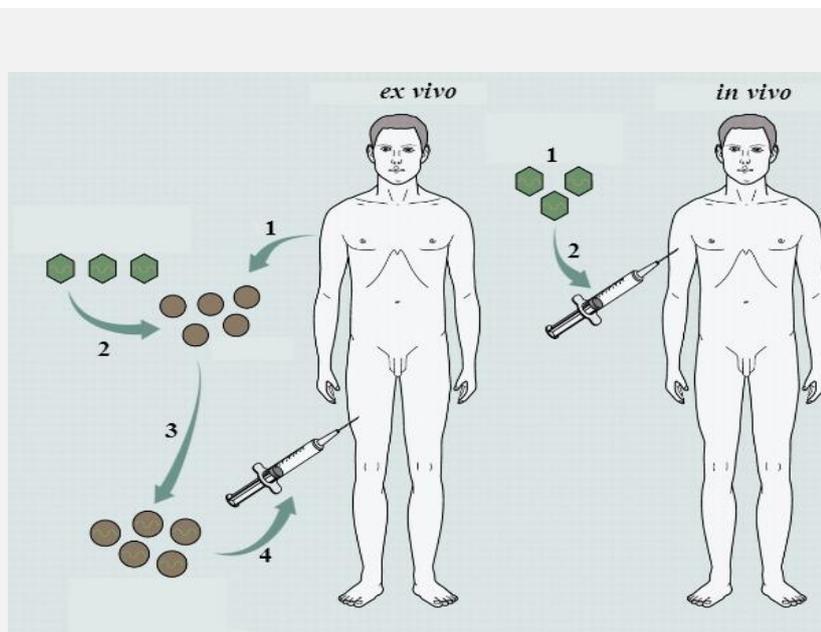


Figura 13. Etapas envolvidas na terapia genética com um vetor viral (<http://www.usp.br/aun/index.php>).

Para introdução de genes nos organismos pode ser executada de duas formas: a introdução *in vivo* e a introdução *ex vivo*, figura 14. Na estratégia *ex vivo* consiste na modificação das células de um tecido-alvo retiradas de um paciente e cultivadas *in vitro* posteriormente são expandidas e reintroduzidas no paciente onde vão expressar o gene exógeno desejado. Na estratégia *in vivo*, os vetores eficientes, como os adenovírus, podem transportar o transgene (material genético transferido) diretamente ao órgão alvo (como o fígado) através de uma injeção endovenosa, levando à eficiente expressão do transgene.



Ex vivo:

1. Colheita e cultivo *in vitro* das células do paciente;
2. Transdução com vetor carregando o gene terapêutico;
3. Seleção e expansão das células com gene terapêutico;
4. Reintrodução das células modificadas no paciente.

In vivo:

1. Formulação apropriada do vetor que carrega o gene terapêutico;
2. Injeção direta do vetor no tecido-alvo do paciente.

Figura 14. Estratégias usadas na terapia gênica *in vivo* e em *ex vivo*. (<http://www.bmj.com>).

Os Vírus são vetores génicos por excelência que têm evoluído há milhões de anos na natureza em associação com todos os organismos desde as bactérias até plantas e animais. Os sistemas biomoleculares específicos de transferência, recombinação e expressão génica dos vírus constituem instrumentos poderosos para a construção de vetores cada vez mais eficientes e seguros.

Na figura 15, pode ver-se representada a distribuição dos diferentes tipos de vetores que têm sido utilizados em protocolos clínicos. Como pode ser observado, os vetores derivados de adenovírus e retrovírus são os principais veículos para ensaios em seres humanos, contribuindo com 50 % de todos os testes. Outros vírus muito utilizados são os derivados de vírus adenoassociados (AAV), vírus não-patogénicos, que, apesar de muito limitados no espaço disponível para o transgene, permitem a sua expressão durante bastante tempo, induzindo fraca resposta imunológica, e os derivados de vírus da família *poxviridae* como o *vaccinia*, empregues em seres humanos durante mais de dois séculos em processos de imunização contra a varíola (Dani, 2002).

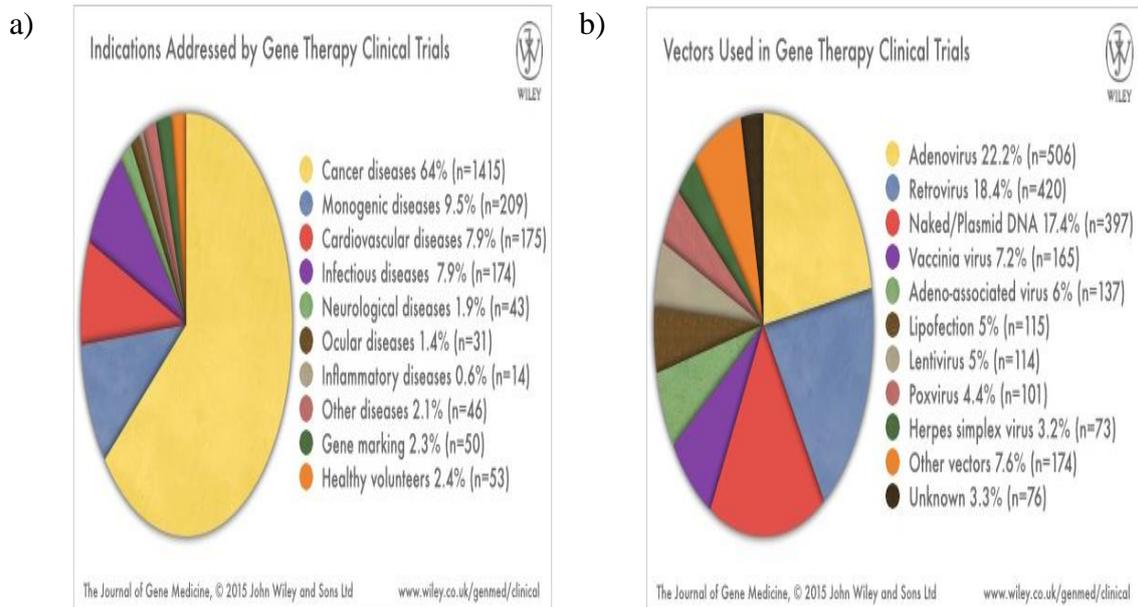


Figura 15. Distribuição dos protocolos clínicos por (a) tipo de vetor; (b) segundo as patologias (<http://www.wiley.com>).

Apesar de ser uma terapia promissora a terapia genética apresenta algumas limitações, nomeadamente:

- *Eficiência da transferência*- Nos estudos de terapia genética, a maior parte dos esforços são concentrados na descoberta de vetores que possam transferir o DNA de modo eficiente, principalmente para as células desejadas.
- *Duração da expressão*- A terapia genética é praticamente inútil se a expressão do gene estranho não for mantida por um período adequado de tempo. As pesquisas estão orientadas para o desenvolvimento de sistemas com uma expressão duradoura, de modo a submeter o paciente a um único tratamento, ou a tratamentos repetidos em períodos maiores (anos).
- *Segurança do procedimento* - É um problema particularmente para os vetores virais, pois alguns vetores derivam de vírus perigosos como o VIH, sendo necessário que estes vetores sejam submetidos a critérios de segurança, particularmente no que concerne a presença de genes que podem determinar a patogenicidade do vírus utilizado para transferir o gene desejado para as células do hospedeiro.
- *Reação imunitária* - Como toda substância estranha ao organismo, o vetor pode induzir uma resposta imunitária sob tratamento podendo causar a eliminação das células modificadas geneticamente, ou a inativação da proteína produzida pelo gene novo.

Apesar destas limitações espera-se que a terapia genética se torne uma abordagem básica para a promoção da saúde e tornando-se um método universal na prevenção de doenças e no desenvolvimento de tratamentos. Os bacteriófagos, baculovirus, retrovirus, adenovirus e vírus adenoassociados são exemplos de vírus que foram modificados com sucesso pelas técnicas do DNA recombinante e são aplicados na agricultura e na medicina. Na tabela 2, apresentam-se os diferentes vírus estudados (Dani, 2002).

Tabela 2. Métodos Biológicos utilizados na introdução de genes em células de mamíferos (Dani, 2002).

Vetores	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus VIH	Alta taxa de transdução; amplo espectro de células hospedeiro (somente células em divisão); insercional; sistema muito bem estudado; integração no genoma hospedeiro; proteínas do vetor não expressas no hospedeiro. Infetam e transduzem células mitóticas e pós-mitóticas por longo prazo.	Imunogénico; requer células em divisão; risco de mutagénese risco de reversão para o tipo selvagem; inativação pelo complemento; baixos títulos; baixa taxa de integração <i>in vivo</i> . Sistema pouco conhecido; eficiência baixa <i>in vivo</i> .
Adenovírus	Amplo espectro de células do hospedeiro (células mitóticas e não mitóticas); altos títulos; eficiência de transdução;); genoma viral episomal; vírus selvagem causa doença leve; não envelopado.	Imunogénico; reversão para o tipo selvagem; período curto de expressão génica em células em divisão (depuração do episoma); vazamento de proteínas virais.
Adeno-associados	Amplo espectro de células do hospedeiro; nenhuma doença humana associada; infecta células em divisão ou paradas; integração dirigida é preferencial.	Limite ao empacotamento de DNA; integração não é sempre sítio-dirigida; possivelmente imunogénico.
Híbridos; Adenovírus-AAV	Amplo espectro; altos títulos; alta eficiência de transdução; integração dirigida.	Imunogénico.
Herpes simples	Episomal; pode induzir infeção latente por toda a vida (especialmente no SNC); acomoda insertos grandes; produção de altos títulos.	Imunogénico; vírus diferentes têm seletividade diferente; EBV é oncogénico; ativação de vírus latente; baixa; eficiência de transdução; expressão transitória nos vetores atuais; sistema em desenvolvimento.
Vaccinia	Potencial para desenvolvimento de uma grande variedade de vacinas genéticas.	Uso limitado aos indivíduos não previamente vacinados; uso não indicado em imunossuprimidos.

4. Conclusão

Uma vez que todos os organismos são infetados por vírus, existe uma grande possibilidade de infeções e de transferência de genes virais entre os diferentes seres vivos, confirmando o papel dinâmico dos vírus na circulação dos genes na biosfera.

Durante uma infeção, alguns mutantes do agente infeccioso são favoravelmente selecionados devido à sua eficiência de transmissão e sobrevivência no hospedeiro. Deste modo, uma doença infecciosa tende a assumir uma condição que garanta, ao máximo a sobrevivência do agente infeccioso, o que garante a sua sobrevivência no tempo e no espaço.

Por outro lado, este mecanismo evolutivo não é unilateral. O hospedeiro também evoluiu com as infeções de modo a tornar-se resistente a elas, dando origem a pressões seletivas que levam à seleção de agente infecciosos capazes de vencer estas barreiras e reinstalar a infeção. Portanto, as doenças infecciosas evoluem segundo um jogo de pressões seletivas cujo resultado final será a garantia de existência do hospedeiro e do agente infeccioso.

O papel dos vírus no planeta transcende a visão estreita de que são apenas agentes causadores de doenças. Nos últimos anos, numerosos estudos sugerem que os vírus de vários tipos podem ter contribuído para a evolução de importantes características dos hospedeiros ajudando a construir a teia que forma a árvore da vida.

O genoma humano bem como o da maioria dos organismos eucarióticos contém um número significativo de HERVs, isto é, sequências resultantes de infeções virais anteriores inseridas de forma permanente.

Estima-se, que 8,3% do genoma humano seja formado por esses fragmentos genéticos dos vírus, em consequência de infeções virais ocorridas ao longo de cerca de 3,5

milhões de anos de evolução. Esta percentagem é superior à dos genes funcionais existentes no nosso genoma (4% a 5%), o que leva a indagar quantas mais sequências virais têm função no nosso organismo.

A presença no genoma humano de genes originados de um retrovírus e que contêm informações para a produção desta proteína crucial para a placentação e para a manutenção do feto na gravidez é um forte indício de que uma infeção por retrovírus ocorrida há milhões de anos pode ter sido fundamental para a evolução dos mamíferos placentários.

Recentemente foi confirmado a integração de sequências de genes de outros vírus (de RNA ou de DNA) no genoma dos hospedeiros, o que reforça a ideia de que estas entidades teriam permitido a evolução de organismos de diversas espécies incluindo a humana. Embora ainda se desconheça o impacto de sua presença na evolução dos hospedeiros, há casos documentados de genes de *parvovírus*, *circovírus*, *filovírus* e *bornavírus* em genomas de muitos vertebrados.

Por outro lado perspectiva-se que nos próximos 20 anos seja possível com a terapia génica tornar a medicina mais preventiva, e o diagnóstico e as terapias mais específicos e efetivos, integrados ao aconselhamento genético dentro do serviço médico apesar das limitações em relação à eficiência e direcionamento dos vetores de transferência genética.

No entanto, os vetores virais recombinantes são os veículos mais potentes e promissores para a transferência genética apesar da resposta imunológica do hospedeiro e as dificuldades de produção em larga escala e padronização ainda serem grandes barreiras para seu uso clínico.

5. Bibliografia

Abrantes, J. et al. (2010). The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. *Thieme eJournals*, 77(4), pp. 339-344.

Amabis, J. M. e Martho, G. R. (2009). *Biologia dos Organismos*, São Paulo: Editora Moderna.

Cann, I.K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S., Ishino, Y., 1998. A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14250–14255.

Claverie, J. M. (2006). Viruses take center stage in cellular evolution. *Genome biology*, 7(6) PMID: 16787527

Dani, S. U. (2002) Terapia génica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 7, pp. 28-33

Azevedo *et al.* (2000). Transgênicos e evolução dirigida. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, VII (2), pp. 451-464)

Dobzansky, T. (1973). *Genética do processo evolutivo*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo.

Ebert, D. (1994). Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science*, 265, pp. 1084-1086.

Ewald, P.W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 14, pp. 465-485.

Ewald, P. W. (1987). Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 503, pp. 295-306.

Ewald, P. W. (1993). The evolution of virulence. *Sci. Am.*, 268 (86), pp. 56-62.

Ewald, P. W. e Schubert, J. (1989). Vertical and vector-borne transmission of insect endocytobionts, and the evolution of benignity. In: Schwemmler, W. & Gassner, G, ed. *Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics* Boca Raton, CRC Press, pp. 21-35.

Fenner, F. e Ratcliffe, F. N. (1966). *Myxomatosis*. Cambridge: Cambridge University Press.

Ferreira, W. e Sousa, J. (1998). *Microbiologia*, Volume 1. 1ª edição. Lisboa, Lidel.

Filée, J., Forterre, P. e Laurent, J. (2003). The role played by viroses in the evolution of their hosts: a view based on informational protein phylogenies. *Res. Microbiol.* 154 (4), pp. 237-243.

Flint, S. et al. (2009). *Principles of Virology*. 3ª edição. USA, ASM Press.

Forterre, P. (2005). The two ages of RNA world, and the transition to the DNA world, a story of viroses and cells. *Biochimie*, 87, pp. 793-803.

Forterre, P. (2006). The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Researc*, 117, pp. 5–16

Forterre, P. e Prangishvilia, D. (2009). The Great Billion-year War between Ribosome- and Capsid-encoding Organisms (Cells and Viruses) as the Major Source of Evolutionary Novelties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1178, pp. 65–77.

Forterre, P. e Prangishvilia, D. (2013) *Current Opinion in Virology* Volume 3. 5ª edição, pp.558–565

Forterre, P., Filée, J. e Myllykallio, H. (2004). Origin and evolution of DNA and DNA replication machineries. In: Ribas de Pouplana, L. (Ed), *The Genetic Code and Origin of Life. Landes Bioscience*, pp. 145-168.

Gadelle, D., Filée, J., Buhler, C., Forterre, P., 2003. Phylogenomics of type II DNA topoisomerases. *Bioessays* 25, 232–242.

Giorgio, S. A. (1994). Esperteza dos invasores. *Ciênc. Hoje*, 18(101), pp. 11-12.

Koonin, E. V. *et al.* (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology Direct*, 1 PMID: 16984643

Krogh, B.O., Shuman, S., 2002. A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1853–1858.

Lazcano, A. *et al.* (1988). The evolutionary transition from RNA to DNA in early cells. *J. Mol. Evol.*, pp. 283-290

Lopes, S. e Rosso, S. (2010). *Biologia*. São Paulo: Saraiva.

Lyer, L. M *et al.* (2005). Origin and evolution of the archeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic Acids Res.* 33, pp. 3279-3896.

Madigan, *et al.* (2004). *Microbiologia de Brock*. New Jersey: Prentice-Hall.

McKenna e Faulkner (2001). *Virus structure, In Encyclopedia of Life Sciences*: New York: John Wiley & Sons.

Menck, C. F. M. e Ventura, A. M. (2007). Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *REVISTA USP*, 75, pp. 50-61.

Miller, E. S. *et al.* (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiol. Mol. Biol.*, 67, pp. 86-156.

Minor, Philip D (2007). *Viruses. In Encyclopedia of Life Sciences*, New York, John Wiley & Sons.

Myllykallio, H. *et al.* (2002). Na alternative Flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* 297, pp. 105-107.

Pereira, F. e Amorim, A. (2013). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2ª edição. pp. 566-568.

Santos, N. S. O. *et al.* (2008). Introdução a virologia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Sentís, C. (2002). Retrovirus endógenos humanos: significado biológico e implicações evolutivas. *ARBOR*, 677 (5), pp. 135-166.

Tavares, T. M. (2005). Vírus entéricos veiculados por água, aspetos microbiológicos e de controle de qualidade da água. *Revista de Patologia tropical*. 34 (2), pp. 85-104.

Tenório, L. Z. *et al.* (2008). A Potencialidade dos Lentivetores na Terapia Gênica. *Rev Bras Clin Med*, 6, pp. 260-267.

Trager, W. (1986). *Living together-the biology of animal parasitism*. New York: Plenum Press.

Van Blerkon, L. M. (2003). Role of Viruses in Human Evolution. *Yearbook of Physical Anthropology*, 46, pp. 14-46.

Villarreal, L. P. (2004). Can Viruses Make Us Human? *Proceedings of the American Philosophical Society*, 148, (3), pp. 296-324.

Villarreal, L. P. (2007). Virus-host symbiosis mediated by persistence. *SYMBIOSIS*, 43, pp. 1-9.

Wagner, E. e Hewlett, M. (2004). *Basic Virology*. 2ª edição. USA, Blackwell Publissing.

Wessner, D. R. (2010). The Origins of Viruses. *Nature Education*, 3 (9).

Witzany, G. (2008). The Viral Origins of Telomeres and Telomerases and their Important Role in Eukaryogenesis and Genome Maintenance *Biosemitotics*, 1 (2), pp. 191-206.

Bibliografia das figuras

<http://bmj.com/content/bmj/315/7118/1289/F1.large.jpg> [Consultado em 25/02/2016]

http://cc04-10.med.up.pt/Microdesgravadas/34_VirusDNA.pdf [Consultado em 25/02/2016]

<http://hypescience.com/genes-cromossomos-dna-genoma> [Consultado em 25/02/2016]

<http://nobelprize.org> [Consultado em 25/02/2016]

<http://pt.wikipedia.org/wiki/V%C3%ADrus> [Consultado em 25/02/2016]

<http://studyblue.com/notes/note/n/lecture-14-virus-i/deck/8442496> [Consultado em 25/02/2016]

<http://thegeneticsofvirusesandbacteria.weebly.com/diagrams.html> [Consultado em 25/02/2016]

<http://usp.br/aun/exibir.php?id=7321> [Consultado em 25/02/2016]

<http://virtualmuseum.ca/edu/ViewLoitDa.do;jsessionid=FB EF0AD22438A7C4BD18B BB2C7F050B1?method=preview&lang=EN&id=18153> [Consultado em 25/02/2016]

<http://wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical> [Consultado em 25/02/2016]

Lopes, S. e Rosso, S. (2010). *Biologia*. São Paulo: Saraiva.

Madigan, *et al.* (2004). *Microbiologia de Brock*. New Jersey: Prentice-Hall.

McKenna e Faulkner (2001). *Virus structure, In Encyclopedia of Life Sciences*: New York: John Wiley & Sons.

Vírus e Retrovírus
Contributo para a Evolução das Espécies