

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

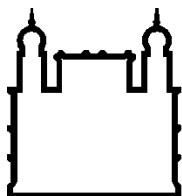
STEPHANIE TREIBER

**Avaliação de pseudopeptídeos
derivados do ácido tartárico na
replicação dos poliovírus.**

Orientador: Dr. Edson Elias da Silva

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na replicação dos poliovírus.

Por: Stephanie Treiber

Orientador: Dr. Edson Elias da Silva

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração Virologia.

RIO DE JANEIRO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Treiber, Stephanie

Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na replicação dos poliovírus. XIV; 75p.

Mestrado [Pós Graduação *Strictu Senso* em Biologia Parasitária]

Instituto Oswaldo Cruz. 2013.

Orientador: Edson Elias da Silva

Referências bibliográficas: 61-75.

1. Poliovírus; 2. Poliomielite; 3. Antivirais; 4. Protease

I. Da Silva, Edson Elias; II. Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Mestrado em Ciências Biológicas; III. Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na replicação dos poliovírus.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

FOLHA DE APROVAÇÃO

STEPHANIE TREIBER

**Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na
replicação dos poliovírus.**

Orientador: Dr. Edson Elias da Silva

Aprovada em:

Banca examinadora

Dra Natália Motta de Araújo - Fiocruz

Dra Vanessa Salete de Paula - Fiocruz

Dr Davis Fernandes Ferreira - UFRJ

Dr Túlio Machado Fomian- Fiocruz

Dra Tatiana Xavier de Castro - UFF

Agradecimentos

Acima de tudo agradeço à minha mãe que sempre foi minha inspiração neste trabalho! Na esperança de nunca mais nenhuma criança sofrer do mal da pólio como ela sofreu.

Ao meu orientador, Dr. Edson Elias da Silva, por me ajudar a trabalhar com pólio que sempre foi meu sonho, pela ajuda e apoio que me deu desde que entrei no laboratório.

À Dra. Eliane, pela paciência, calma e simpatia, sempre!

À todas as meninas do LEV, Amanda, Camila, Cris, Elaine, Éricka, Fernanda, Gabi, Gina (e Luísa!), Josi, Lidiane, Larissa, Renata, Sara, pela ótima convivência e bom humor.

À Juliana, Yasmine e Oscar, que se tornaram muito mais que colegas de aula mas verdadeiros amigos! Obrigada por ficarem comigo em aula mesmo quando eu só queria conversar...

À minha amiga Larissa que é o meu maior modelo, uma mulher linda, excelente mãe, ótima profissional, detentora de um dos maiores corações que já conheci! Uma das melhores amigas que eu poderia ter, obrigada pela sua amizade tão preciosa e por estar sempre ao meu lado (mesmo quando só ao telefone quando o Bê está doente!).

À minha irmã Joana e ao meu namorado Davidson, por estarem sempre comigo, do início ao fim! Pra sempre! E com muito amor!

Ao Dr Joaquim Mendes Silva e seu aluno de doutorado Ricardo Yaunner, por terem sintetizado e cedido os compostos testados neste trabalho.

À Fiocruz, pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Lista de símbolos e abreviaturas	<i>vii</i>
Lista de figuras	<i>ix</i>
Lista de tabelas	<i>x</i>
Lista de gráficos	<i>xi</i>
Resumo	<i>xii</i>
Abstract	<i>xiii</i>
Résumé	<i>xiv</i>

Introdução

1. Poliovírus.....	1
1.1 Partícula Viral	2
1.2 Estrutura do genoma	3
1.3 Replicação dos poliovírus	6
1.4 Proteases	10
1.4.1 Protease 2A	14
1.4.2 Proteases 3C/3CD	16
2. Poliomielite	17
2.1 Transmissão e Patogenia	17
2.2 Vacinas	19
2.2.1 IPV – Vacina Inativada ou Salk	20
2.2.2 OPV – Vacina atenuada ou Sabin	20
2.2.3 Poliovírus vacinais derivados (VDPV)	21
2.3 Epidemiologia	22
2.4 Erradicação	22
2.5 Desafios da erradicação	24
3. Antivirais	29
3.1 Antivirais para poliovírus	30
Justificativa	33
Objetivo	35

Materiais e Métodos

1. Cultura de células	36
2. Vírus	37
3. Moléculas	37
4. Determinação da viabilidade celular	41
5. Infecção das células	41

Resultados

1. Efeito das moléculas sobre a viabilidade celular	43
2. CC ₉₀	51
3. Efeito antiviral das moléculas sobre o poliovírus	52

Discussão	55
------------------------	----

Conclusão	60
------------------------	----

Bibliografia	61
---------------------------	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDC	Centro de Controle de Doenças e Prevenção (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
cm ²	Centímetro quadrado
cVDPV	Poliovírus Derivado da Vacina Circulante
DENV	Vírus da Dengue
DENV-2	Vírus da Dengue tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPT	Difteria – Tétano - Pertussis
EC	Efeito Citopático
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramma
GPEI	Iniciativa Global de Erradicação da Pólio
HBV	Vírus da Hepatite B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRV	Rinovírus Humano
IPV	Vacina Inativada contra Pólio (Salk)
IRES	Sítio Interno de Entrada do Ribossomo (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

L20B	Linhagem celular de camundongos geneticamente modificada que expressa o receptor humano do poliovírus
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMWR	Relatório Semanal de Morbidade e Mortalidade (<i>Morbidity and Mortality Weekly Report</i>)
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
OPV	Vacina Oral atenuada contra Pólio (Sabin)
PAHO	Organização Panamericana de Saúde (<i>Pan American Health Organization</i>)
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	Paralisia Flácida Aguda
PV	Poliovírus
PXQMed	Laboratório de Química Medicinal do Pólo de Xistoquímica
RD	Células diplóides derivadas de rabdiossarcoma embrionário humano
r.p.m	Rotações por minuto
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RNA_{pol}	Ácido Ribonucléico Polimerase
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VAPP	Poliomielite Paralítica Associada à Vacina
VDPV	Poliovírus derivado da Vacina (vacinal)

LISTA DE FIGURAS

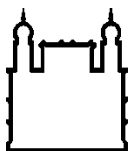
Figura 1. Estrutura do poliovírus.	3
Figura 2. Organização do genoma dos poliovírus	5
Figura 3. Ciclo de replicação dos poliovírus	9
Figura 4. Processamento da poliproteína pelas proteases 2A e 3C/3CD	12
Figura 5. Estrutura tridimensional da protease 2A dos poliovírus	15
Figura 6. Estrutura da protease 3C dos poliovírus	16
Figura 7. Patogenia dos poliovírus	19
Figura 8. Áreas endêmicas de poliovírus selvagem em 1988 e em 2012	24
Figura 9. Diminuindo o território da pólio	26
Figura 10. Efeito citopático do poliovírus em células L20B	53
Figura 11. Efeito citopático do poliovírus em células RD	54
Figura 12. Estrutura geral do composto protótipo	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos Enterovírus.	2
Tabela 2. Famílias de enzimas proteolíticas.	11
Tabela 3. CC ₉₀	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Viabilidade de células RD com RY152	44
Gráfico 2. Viabilidade de células RD com RY136	44
Gráfico 3. Viabilidade de células RD com RY108	45
Gráfico 4. Viabilidade de células RD com RY218B	45
Gráfico 5. Viabilidade de células RD com P2	46
Gráfico 6. Viabilidade de células RD com P6	46
Gráfico 7. Viabilidade de células RD com RY200	47
Gráfico 8. Viabilidade de células L20B com RY152	47
Gráfico 9. Viabilidade de células L20B com RY136	48
Gráfico 10. Viabilidade de células L20B com RY108	48
Gráfico 11. Viabilidade de células L20B com RY218B	49
Gráfico 12. Viabilidade de células L20B com P2	49
Gráfico 13. Viabilidade de células L20B com P6	50
Gráfico 14. Viabilidade de células L20B com RY200	50



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STEPHANIE TREIBER

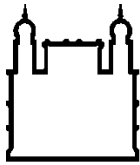
RESUMO

Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na replicação dos poliovírus.

Os poliovírus são responsáveis por causar a poliomielite, mais conhecida como paralisia infantil ou pólio, que já foi de alta incidência no Brasil e em muitos outros países, deixando centenas de indivíduos com sequelas paralíticas. Atualmente, esta doença é rara no mundo devido ao sucesso da utilização sistemática da vacina oral atenuada. Em 1988, a OMS lançou um programa para erradicar a pólio mundialmente e o desenvolvimento de antivirais contra poliovírus é considerado uma condição necessária para o sucesso deste programa.

Neste trabalho, analisou-se a possível atividade antiviral de sete pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na replicação dos poliovírus em culturas celulares. Essas moléculas foram sintetizadas racionalmente de acordo com os alvos específicos virais (as proteases virais). A viabilidade celular foi avaliada através da incorporação do vermelho neutro pelas células vivas e posterior quantificação por espectrofotômetro. A avaliação da atividade antiviral foi realizada através da observação do efeito citopático nas células infectadas por poliovírus que foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos. Os compostos testados neste estudo apresentaram faixas de concentração não-tóxicas às células, mas não afetaram a replicação dos poliovírus, não apresentando, portanto, nenhuma atividade antiviral. De qualquer maneira, estudos sobre o potencial antiviral de moléculas candidatas é de extrema importância e devem ser estimulados, uma vez que atualmente, não existe nenhum composto antiviral contra poliovírus aprovado para uso em humanos.

Palavras chaves: 1. Poliovírus; 2. Poliomielite; 3. Antivirais; 4. Protease.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STEPHANIE TREIBER

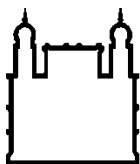
ABSTRACT

**Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na
replicação dos poliovírus.**

Poliovirus (PV) are the causative agent for causing poliomyelitis, better known as infantile paralysis or polio, a disease that has already been of high incidence in Brazil and many other countries, leaving hundreds of people with paralytic disabilities. Currently, this disease is rare in the world due to the success of systematic use of the attenuated oral vaccine. In 1988, the World Health Assembly launched a program to eradicate polio worldwide and the development of anti-poliovirus drugs is a necessary condition for the success of this program.

In this study, we analyzed the possible antiviral activity of seven pseudopeptides derived from tartaric acid on the replication of poliovirus in cell cultures. These molecules have been synthesized according to a specific target, the viral proteases. Cell viability was assessed using neutral red incorporation by living cells and subsequent quantification by spectrophotometer. Evaluation of the antiviral activity was performed by observing the cytopathic effect in in PV-infected cells that were incubated with different concentrations of the compounds. The compounds tested in this study showed concentration ranges non-toxic to cells but did not affect the replication of poliovirus, not showing, thus, an antiviral activity. Either way, studies on potential inhibitors of PV are extremely important and should be encouraged, since currently there is no poliovirus antiviral compound approved for use in humans.

Key words: 1. Poliovirus; 2. Poliomyelitis; 3. Antivirals; 4. Protease.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STEPHANIE TREIBER

RÉSUMÉ

Avaliação de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico na replicação dos poliovírus.

Les poliovirus sont les agents responsables de la poliomyélite, mieux connue sous le nom de polio, une maladie qui sévissait au Brésil et dans le monde entier, laissant des centaines de personnes avec des séquelles paralytiques. Actuellement, cette maladie est rare sur la planète en raison du succès de l'utilisation systématique du vaccin oral atténué. En 1988, l'Organisation Mondiale de la Santé a lancé un programme visant l'éradication de la polio et le développement de médicaments antiviraux contre le poliovirus est considéré comme une condition nécessaire à la réussite de ce programme.

Dans cette étude, nous avons analysé la possible activité antivirale de sept pseudopeptides dérivés de l'acide tartrique sur la réplication du poliovirus dans des cultures cellulaires. Ces molécules ont été synthétisées rationnellement en fonction de leurs cibles virales (les protéases virales). La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide de l'incorporation du colorant vitale rouge neutre par les cellules vivantes et la quantification par lecture au spectrophotomètre. L'évaluation de l'activité antivirale a été réalisée en observant l'effet cytopathique des cellules infectées par le poliovirus qui ont été incubées avec différentes concentrations des composés. Les dérivés testés dans ce travail possèdent des gammes de concentration non-toxique aux cellules, mais sans incider sur la réplication du poliovirus, ne montrant donc pas d'activité antivirale. Quoi qu'il en soit, les études sur les anti-poliovirus sont extrêmement importantes et devraient être encouragées, car il n'existe actuellement aucun antiviral contre les poliovirus approuvé pour utilisation humaine.

Mots-clés: 1. Poliovirus; 2. Poliomyélite; 3. Antiviraux; 4. Protéase.

INTRODUÇÃO

1. Poliovírus.

Os poliovírus são vírus pertencentes ao gênero Enterovírus, da família *Picornaviridae*, cujos agentes virais podem infectar tanto humanos quanto animais. O nome desta família é derivado da combinação das palavras “pico” (pequena unidade de medida [10^{-12}]) com “RNA” (ácido ribonucléico) e “vírus”. Os picornavírus são portanto vírus pequenos com genoma de RNA (Racaniello, 2001). Eles formam uma das maiores e mais diversificadas famílias de vírus e são responsáveis por causar doenças de grande importância médica e econômica (Ehrenfeld *et al.*, 2010), como a poliomielite, a hepatite A, a febre aftosa e o resfriado comum, dentre outras (Tuthill *et al.*, 2010).

O Poliovírus é possivelmente o mais conhecido e mais pesquisado de todos os vírus de seu gênero e serve de modelo de estudo para todos os outros enterovírus (Wimmer *et al.*, 1993; Melnick, 1996). Existem 3 tipos antigênicos dos poliovírus: os sorotipos 1, 2 e 3 (Bodian & Morgan, 1949), e todos eles podem causar a poliomielite que também é conhecida como paralisia infantil. Devido a uma nova classificação taxonômica, a espécie Poliovírus não existe mais e os três sorotipos passaram a pertencer à espécie Enterovírus Humano C (Hughes, 2004; Younessi *et al.*, 2012) (ver **Tabela 1**). Vale ressaltar que esta classificação evolui continuamente graças às ferramentas moleculares atualmente disponíveis e a descoberta constante de novos sorotipos.

A maioria das infecções humanas por enterovírus é inaparente mas eles podem causar uma grande variedade de doenças, desde brandas à fatais, incluindo quadros graves envolvendo o sistema nervoso central (SNC) (Melnick, 1984).

Gênero	Espécies
Enterovírus	Enterovírus Humano A, B, C* e D
	Enterovírus Símio A
	Enterovírus Bovino A
	Enterovírus Suíno A
	Rinovírus Humano A, B e C

Tabela 1. Classificação dos Enterovírus. Os Enterovírus constituem o maior gênero dentro dos picornavírus, com 10 espécies, das quais 7 são capazes de infectar seres humanos (Norder *et al.*, 2011).

*A espécie Enterovírus Humanos C inclui todos os sorotipos de poliovírus.

1.1 Partícula Viral

Os Poliovírus, assim como todos os membros da família *Picornaviridae*, são pequenos (com cerca de 30 nm), esféricos, não-envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica envolvendo o genoma viral, um RNA de fita simples e polaridade positiva. O RNA de fita única, por ser de polaridade positiva, é o próprio RNA mensageiro (RNAm).

O capsídeo é composto por quatro proteínas, formadas a partir da clivagem da poliproteína, que se organizam em torno do genoma formando a simetria icosaédrica; as proteínas VP1, VP2 e VP3 se encontram na superfície da partícula viral enquanto a proteína VP4, que é menor, não fica exposta, estando associada ao genoma viral. Estas quatro proteínas estão presentes nas 60 subunidades que formam o capsídeo, permitindo sua estabilidade.

Essas 60 subunidades são chamadas de protômeros e se agregam rapidamente em pentâmeros. Inicialmente, esses pentâmeros se juntam para formar o procapsídeo que é composto por apenas 3 polipeptídeos: VP0, VP3 e VP1. O empacotamento do RNA leva a uma quebra espontânea de maturação, em que VP0 é clivado em VP4 e VP2. Com isso forma-se o capsídeo completo e maduro com suas 4 proteínas estruturais (Hogle *et al.*, 1985).

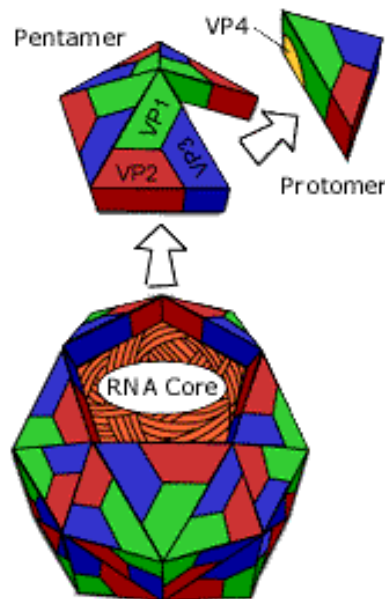


Figura 1. Estrutura do poliovírus. Os polipeptídeos VP1, VP2 e VP3 estão expostos na superfície do vírion, enquanto VP4 fica internalizado no cerne do RNA (Hogle *et al.*, 1985). O conjunto dessas 4 proteínas estruturais forma um protômero. O capsídeo viral é composto por 12 pentâmeros que são formados por 5 protômeros (Jacobson & Baltimore, 1968; Phillips & Fennel, 1973).

Figura retirada de: <http://www.hhmi.org/biointeractive/disease/polio/polio1.html> (acessado em 04/11/2012).

1.2 Estrutura do genoma

O genoma dos poliovírus é constituído por uma molécula linear de RNA de filamento simples, polaridade positiva e comprimento aproximado de 7400 nucleotídeos (Wimmer *et al.*, 1983; Agol, 2002). Todos os membros da família *Picornaviridae* têm uma organização genômica similar com uma característica única: a presença de uma pequena proteína viral, chamada VPg, ligada covalentemente na extremidade 5'. O RNA genômico viral só se torna o RNAm e é traduzido após perder a VPg (Lee *et al.*, 1977; Flanagan *et al.*, 1977). A VPg age como um primer para a iniciação da replicação do genoma viral (Nayak *et al.*, 2005). Além da VPg, o genoma viral possui uma longa região altamente estruturada e não codificante, também na extremidade 5', que contém o sítio de entrada do ribossomo (IRES) necessário para o início da tradução viral (Bedard & Semler, 2004). O RNA genômico dos picornavírus ainda abriga uma região não codificante na extremidade

3', seguida de uma cauda poli(A) que parece ser fundamental na infecciosidade e estabilidade do vírus (Spector & Baltimore, 1974).

O RNA viral contém uma única fase de leitura, codificando uma longa cadeia de polipeptídeos, a poliproteína, cujo processamento é mediado pelas proteases virais 2A e 3C/3CD. A parte codificante da poliproteína dos poliovírus pode ser dividida em 3 regiões funcionais: P1, P2 e P3. O segmento P1 vai formar as quatro proteínas estruturais (VP1-VP4) que formam o capsídeo viral. As proteínas geradas do segmento P2 têm sua função mais voltada para as interações com a célula hospedeira, como o rearranjo de membranas celulares, enquanto as originadas de P3 agem mais diretamente na replicação do genoma viral e na interferência da resposta imune do hospedeiro (Cameron *et al.*, 2010; Bedard & Semler, 2004). Com isso, a tradução do genoma viral origina 11 proteínas virais, das quais 4 são estruturais e as outras participam na replicação do vírus (Harvala & Simmonds, 2009) (**Figura 2**). É interessante saber que as proteínas não estruturais dos poliovírus são mais conservadas que as do capsídeo e muitas de suas funções são preservadas em toda a família dos picornavírus, o que sugere uma pressão evolutiva da conservação funcional (Hughes, 2004; Bedard & Semler, 2004).

A poliproteína viral passa por 3 tipos de clivagens: (i) as clivagens que acontecem ainda durante o processo de tradução, na cadeia nascente de polipeptídeos, mediadas pelas proteases virais. A primeira dessas clivagens separa P1, o precursor das proteínas estruturais, do resto dos polipeptídeos não-estruturais e a segunda separa P2 de P3; (ii) as clivagens citoplasmáticas ocorrem sobre os 3 precursores P1, P2 e P3, e seus intermediários, que já se encontram soltos no citoplasma celular e (iii) a hidrólise de VP0 originando VP4 e VP2 para finalizar a montagem do capsídeo e da partícula viral (Skern *et al.*, 2002; Leong *et al.*, 2002). Todos esses eventos de clivagens levam à formação de 11 proteínas maduras e vários intermediários (**Figura 2**).

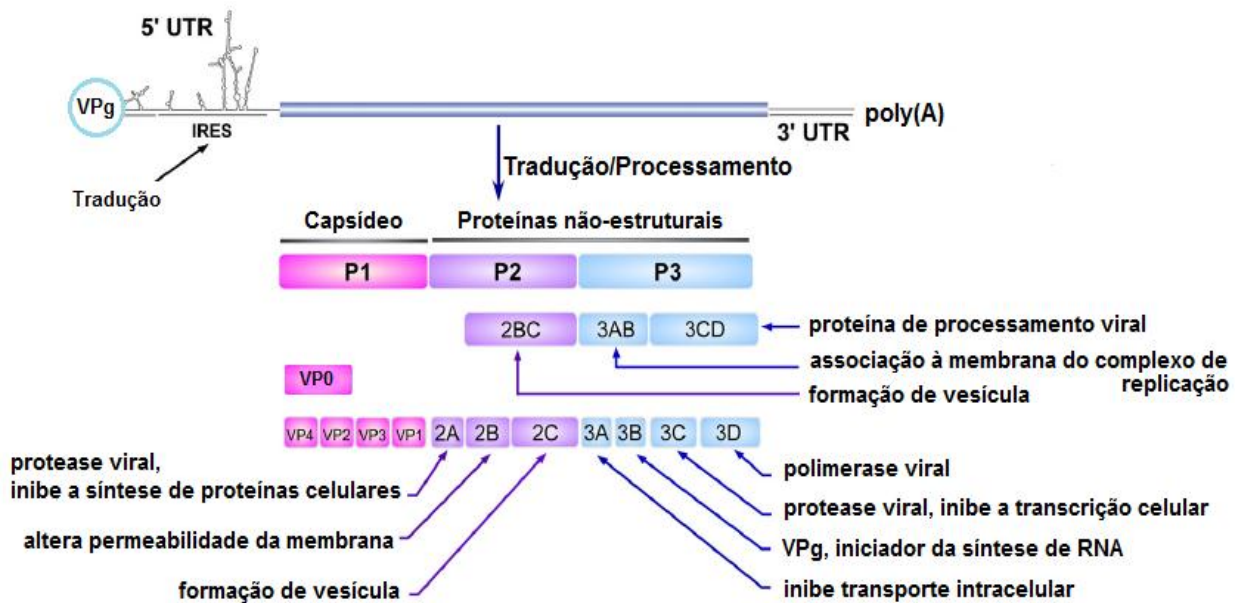


Figura 2. Organização do genoma dos poliovírus. A poliproteína viral pode ser dividida em 3 regiões funcionais: P1, P2 e P3. O segmento P1 (em rosa) vai originar as quatro proteínas estruturais (VP1-VP4) enquanto as regiões P2 (em roxo) e P3 (em azul) codificam proteínas não-estruturais incluindo as proteases 2A e 3C, a RNA-polimerase (3D) e a VPg (3B). O processamento proteolítico da poliproteína origina 11 proteínas maduras e vários intermediários.

Figura adaptada de Jing-Yi Lin et al., 2009.

O processamento proteolítico da poliproteína é uma forma de comprimir a informação genética dos vírus no pequeno e limitado espaço do genoma. Esse processo permite que o genoma de vírus pequenos codifique não só proteínas maduras, que podem ter mais de uma função, mas também intermediários polipeptídicos, como 2BC e 3CD nos poliovírus, que participam ativamente dos processos virais. Esta “estratégia proteolítica” é um mecanismo vantajoso e eficiente utilizado por muitos vírus pequenos de RNA, como todos os picornavírus ou flavivírus, para realizar todas as funções biológicas virais em um espaço genético menor (Blondel *et al.*, 2005; Castelló *et al.*, 2011).

O genoma dos poliovírus está longe de ser estático, assim como todos os vírus da família *Picornaviridae* que têm uma enorme capacidade de se adaptar à mutações (Pariente *et al.*, 2003). A polimerase RNA-dependente desses vírus (3D), responsável por gerar a fita negativa de RNA a partir do RNAm viral, possui uma taxa de mutação de uma em 2200 bases, o que corresponde à aproximadamente 4

mutações por transcrito (De la Torre *et al.*, 1992; Holland *et al.*, 1990; Domingo, 2000; Wells, *et al.*, 2001). Além disso, os poliovírus também passam por um processo de recombinação que consiste na troca de sequências de nucleotídeos entre diferentes moléculas de RNA genômico durante replicação viral, no momento da síntese de uma nova molécula de RNA pela polimerase viral (Agol, 2010; Racaniello, 2001). Esses 2 mecanismos, mutação e recombinação, geram uma grande variabilidade genética desses vírus contribuindo fortemente para a evolução desse grupo (Tapparel *et al.*, 2013).

1.3 Replicação dos poliovírus

A primeira etapa da replicação dos poliovírus é a adsorção através da ligação das proteínas do capsídeo viral aos receptores de superfície CD155 da membrana celular. Um único receptor é suficiente para a entrada dos poliovírus (Jing-Yi Lin *et al.*, 2009). Os sítios primários da replicação são as células epiteliais ou linfóides das mucosas da orofaringe e intestinal. Além desses, os tipos celulares que expressam o receptor CD155 e são suscetíveis à infecção por poliovírus são as células do trato alimentar e do epitélio intestinal, as células M das placas de Peyer – nódulos do tecido linfático associado ao intestino – e nos centros germinais das placas de Peyer (Bodian & Horstmann, 1965; Iwasaki *et al.*, 2002; Racaniello, 2006).

Após a adsorção, o genoma viral é internalizado com a desestabilização e perda do capsídeo. O mecanismo exato da penetração do genoma viral no citoplasma ainda não foi elucidado (De Jesus NH, 2007). O RNA viral é liberado no citoplasma onde ocorre a dissociação da proteína VPg que é clivada por enzimas celulares. O RNA de polaridade positiva, sem a VPg, se torna então o RNA mensageiro, e é traduzido diretamente pelos ribossomos da célula hospedeira (Wimmer, 1982), gerando uma poliproteína. Esta, por sua vez, é clivada por proteases virais (2A e 3C) dando origem a numerosas proteínas essenciais para a replicação e produção de novas partículas virais. A poliproteína não é observada em células infectadas pois ela é processada ainda durante a tradução (assim que a protease é traduzida) e nunca atinge seu comprimento total (Racaniello, 2001).

Com a síntese das proteínas virais, incluindo a polimerase RNA-dependente (3D), a replicação do RNA se inicia e começam a surgir novas cadeias de RNA. A fita simples de RNA positivo é transcrita em uma cadeia complementar de RNA

negativo que servirá de molde para a síntese de novas fitas de RNA positivo (Madigan *et al.*, 1997). Estes eventos ocorrem dentro de um compartimento membranoso, dito complexo de replicação, cuja formação é induzida pelas proteínas virais 2C e 2BC (proteínas originadas do segmento P2 da poliproteína – ver **figura 2**) (Bienz *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1994; Teterina *et al.*, 1997). Esses complexos de replicação se formam devido ao rearranjo das membranas intracelulares da célula hospedeira, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são destruídos, dando lugar a vesículas de dupla membrana preenchidas de citoplasma, que são os complexos de replicação (Schlegel *et al.*, 1996).

As novas cadeias de RNA viral formadas, de polaridade positiva, podem participar de 3 processos: (i) servindo de molde para sintetizar mais moléculas de RNA negativas; (ii) como RNA mensageiro dando continuação ao processo de tradução das proteínas virais; ou (iii) como genoma que vai ser encapsidado originando o províron (Castelló *et al.*, 2011; Nomoto *et al.*, 1977). Neste último caso, a proteína VPg já se encontra ligada à extremidade 5' da fita de RNA positivo nascente (Nomoto *et al.*, 1977). No início da infecção, ocorre preferencialmente a tradução de proteínas virais enquanto que, no final, a prioridade é encapsidar o genoma para montar novas partículas virais (Racaniello, 2001).

Após o genoma viral ter sido encapsidado, o províron fica sujeito a um período de maturação, que envolve uma série de processos de clivagem. A montagem do vírus é finalizada quando ocorre a clivagem de VP0 para VP4 e VP2 (proteínas estruturais originadas do precursor P1), conferindo estabilidade ao capsídeo e tornando os vírus infecciosos (Holland & Kiehn, 1968). Este processo só ocorre depois do RNA ter sido envolvido pelo capsídeo (Prescott *et al.*, 1996). O vírion maduro é uma partícula muito estável e resistente.

A última etapa do ciclo viral é a liberação dos vírus infecciosos na corrente sanguínea através da lise da célula infectada devido à mudanças da permeabilidade da membrana celular que ocorrem na última fase da infecção (Carrasco *et al.*, 2002). Esse evento ocorre devido à formação de poros na membrana mediados pela viroporina 2B e seu precursor 2BC (Agirre *et al.*, 2002; Gonzalez & Carrasco, 2003).

O tempo total de um ciclo replicativo do poliovírus, da adsorção até a lise celular, varia entre 5 e 10 horas dependendo de diversos fatores como a temperatura, pH, a célula hospedeira, entre outros. Ao final de um ciclo completo em uma célula hospedeira, o genoma viral RNA (+) é amplificado em aproximadamente 50 mil

genomas por célula, através de um intermediário de fita simples negativo (Racaniello, 2001).

É interessante notar que a tradução dos genomas dos picornavírus ocorre com eficiência variada em diferentes tipos celulares, o que sugere que os fatores celulares necessários para uma tradução eficiente são mais abundantes em algumas células e escassos em outras (Bedard & Semler, 2004).

As etapas do ciclo dos poliovírus estão descritas na **Figura 3**.

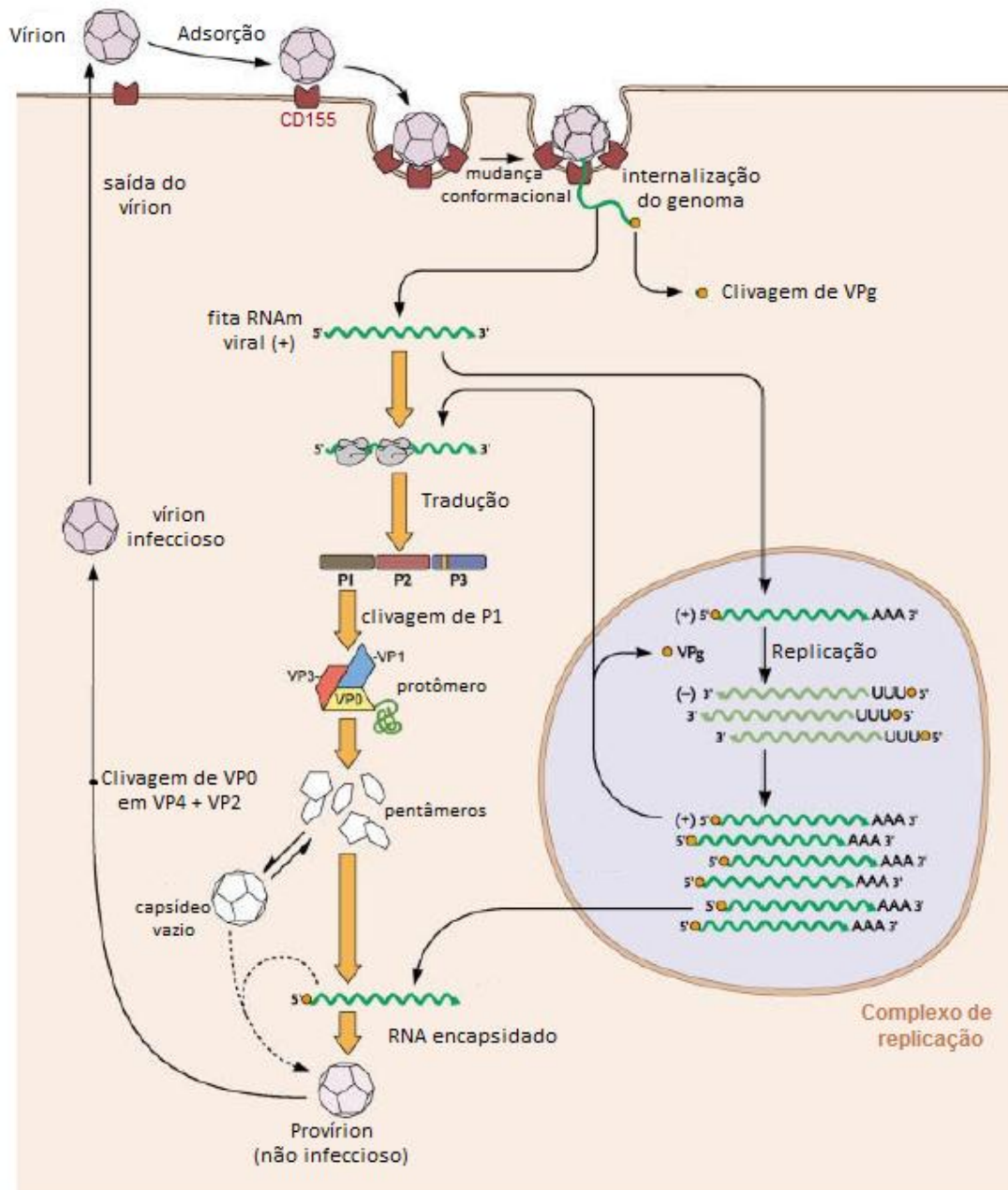


Figura 3. Ciclo de replicação dos poliovírus. A infecção é iniciada pela adsorção através da interação do vírus com o receptor celular CD155. Essa interação induz mudanças conformacionais resultando na perda do capsídeo e na liberação do genoma viral no citoplasma da célula. A proteína VPg é removida do RNA viral por enzimas celulares, e este é então traduzido, pelos ribossomos celulares, em uma poliproteína que dá origem às proteínas virais através do processamento proteolítico. A síntese de RNA ocorre nos complexos de replicação onde o RNA positivo age como molde para a síntese da cadeia negativa complementar que, por sua vez, vai originar muitas fitas de RNAs positivos. Este RNA positivo recém-

sintetizado pode agir como molde para a tradução ou se associar aos precursores do capsídeo para formar o províon. A clivagem de VP0 em VP4 e VP2 finaliza a maturação do víon que é liberado pela lise celular (De Jesus, 2007; Racaniello, 2001). Esquema adaptado de *Principles of Virology* (Flint *et al.*, 2009).

1.4 Proteases

O termo “protease” é sinônimo de peptídeo hidrolase e inclui todas as enzimas que clivam peptídeos. As proteases são classificadas como endopeptidases pois clivam ligações no meio de cadeias polipeptídicas. A clivagem proteolítica de ligações peptídicas é uma das mais freqüentes e importantes modificações pós-traducionais de proteínas (Silva Jr & De Simone, 2001). O termo *proteinase* é também usado como sinônimo para *endopeptidase* (Barrett *et al.*, 2004).

Muitos estudos foram feito em relação às proteases levando à identificação dos componentes e da conformação de seus sítios ativos, permitindo a dedução de seus mecanismos de ação. Como resultado, as proteases, virais e celulares, foram classificadas em famílias de acordo com seus mecanismos catalítico, ou seja, os membros de uma mesma família apresentam estruturas e mecanismos de ação similares (Neurath, 1990; Rawlings& Barrett, 1994; Tremacoldi, 2009).

Existem atualmente seis famílias de proteases divididas dentro de quatro classes reconhecidas pela IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) que são: (i) as serino proteases, (ii) as cisteíno proteases, (iii) as aspártico proteases e (iv) as metalo proteases (**Tabela 2**). Cada família possui um grupo característico de resíduos de aminoácidos funcionais, agrupados em uma configuração particular para formar o sítio ativo. A maior família de todas é a quimotripsina pertencente à classe das serino proteases (Neurath, 1986; Tremacoldi, 2009).

Família	Protease(s) representativa(s)	Sítios ativos
Serino proteases		
Serino protease I	Quimotripsina	Asp, Ser, His
	Tripsina	
	Elastase	
Serino protease II	Calicreína pancreática	Asp, Ser, His
	Subtilisina	
Cisteíno proteases		
Cisteíno protease	Papaína	Cis, His, Asp
	Actinidina	
	Catepsina	
Aspártico proteases		
Aspártico protease	Penicilopepsina	Asp
	Renina	
Metaló proteases		
Metaló protease I	Carboxipeptidase A	Zn, Glu, Try
Metaló protease II	Termolisina	Zn, Glu, His

Tabela 2. Famílias de enzimas proteolíticas. A classificação atual das proteases em quatro classes, ou superfamílias, e seis famílias é baseada nas diferenças da estrutura e do mecanismo de ação destas enzimas.

Tabela adaptada de Neurath (1986) por Tremacoldi (2009).

Uma grande variedade de vírus codificam proteases que realizam funções cruciais durante o ciclo biológico do vírus. Geralmente, essas enzimas virais são responsáveis por catalisar o processamento das poliproteínas virais e dos precursores polipeptídicos, para formar as proteínas maduras; elas também podem atuar no processo de maturação dos procapsídeos (Tong, 2002; Skern *et al.*, 2002). As proteases virais devem combinar atividades catalíticas específicas para o processamento de proteínas do vírus e/ou do hospedeiro para permitir a replicação viral com eficiência, ao ser codificada por um genoma extremamente reduzido (Silva Jr & De Simone, 2001).

Os poliovírus codificam 2 proteases virais, 2A e 3C, que são ativadas já na poliproteína nascente e se liberam por auto-clivagem; ambas são classificadas como cisteíno proteases. O polipeptídeo 3CD, precursor de 3C, é um intermediário viral estável que também possui atividade proteolítica.

O processamento da poliproteína representa uma etapa fundamental da infecção por poliovírus que acontece de forma coordenada e organizada, as clivagens ocorrem durante a tradução da poliproteína, na cadeia nascente de polipeptídeos virais. A protease 2A catalisa a primeira clivagem da poliproteína entre os segmentos P1 e P2 resultando na liberação do segmento P1 (Toyoda *et al.*, 1986). Este segmento é processado pela proteinase 3CD gerando três produtos estáveis, VP0, VP3 e VP1 que são proteínas estruturais que se agregam para formar o procapsídeo viral dos poliovírus (Ypma-Wong *et al.*, 1988). A clivagem de VP0 para formar as proteínas VP2 e VP4 do capsídeo ocorre durante a maturação do vírus mas ainda não se sabe que mecanismo é responsável por este processo (Harber *et al.*, 1991). Todas as outras clivagens da poliproteína são mediadas pela protease 3C (**Figura 4**).

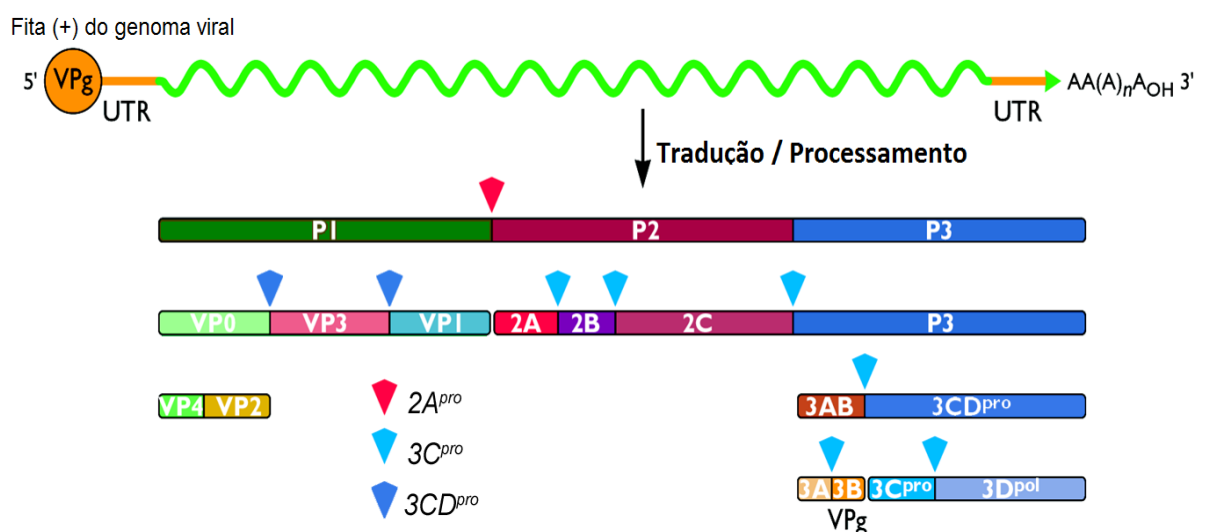


Figura 4. Processamento da poliproteína pelas proteases 2A e 3C/3CD.

A maioria das clivagens da poliproteína são mediadas pela protease 3C; a protease 2A catalisa a primeira clivagem liberando o segmento P1, precursor das proteínas estruturais dos poliovírus. A protease 3CD cliva P1 em VP0, VP3 e VP1. Ainda não se sabe que mecanismo é responsável pelo processamento de VP0 em VP4 e VP2. *Figura retirada e adaptada do site: www.studyblue.com (acessado em 13/10/2012).*

Os poliovírus devem exercer diversas tarefas de forma simultânea dentro de uma célula hospedeira para garantir uma infecção eficiente e uma replicação viral bem sucedida. O pequeno tamanho do genoma dos poliovírus, assim como de todos os picornavírus, exige que esses vírus utilizem proteínas da célula hospedeira para os processos de tradução e replicação do RNA viral. Além de utilizar polipeptídeos celulares, os poliovírus também possuem proteínas e intermediários virais com mais de uma função na replicação viral (Marcotte *et al.*, 2007). Esses patógenos evoluíram para alterar eficientemente as proteínas celulares e interromper as funções da célula alterando todo o ambiente citoplasmático em favor da replicação viral. O sucesso da infecção dos picornavírus depende da habilidade deles em modificar as proteínas celulares; essas alterações parecem ser mediadas principalmente pelas proteases virais. O poliovírus ainda possui mecanismos redundantes em que mais de uma proteína viral têm a função de alterar essas atividades celulares (Chase & Semler, 2012).

As proteases virais clivam não só os polipeptídeos virais (processamento da poliproteína), mas também proteínas da célula hospedeira inibindo diversos mecanismos celulares (Lin *et al.*, 2009) como a transcrição e tradução, ou ainda, o tráfego entre o núcleo e o citoplasma. A inibição desse tráfego resulta em uma redistribuição de certas proteínas celulares que se acumulam no citoplasma onde são envolvidas em processos virais como a replicação ou a tradução viral. A acumulação de proteínas nucleares no citoplasma é muito vantajosa para os poliovírus pois eles são vírus estritamente citoplasmáticos. Todo o ciclo infeccioso deve ocorrer no citoplasma (Chase & Semler, 2012; Fitzgerald *et al.*, 2013).

A desregulação do tráfego nucleo-citoplasmático parece ser um elemento-chave para a inibição da transcrição e tradução da célula hospedeira e para garantir o sucesso da infecção viral de modo geral. A realocação das proteínas nucleares para o citoplasma também pode representar uma forma de evasão do vírus aos sistemas de defesa celular bloqueando a transdução de sinais para o núcleo. É importante lembrar que qualquer alteração do transporte nuclear provoca efeitos profundos na sinalização celular requerida para o funcionamento normal da célula, isso contribui para a patogênese observada (Younessi *et al.*, 2012).

A expressão individual das proteases 2A e 3C leva à indução da maioria dos efeitos citopáticos da célula que são: alterações morfológicas da célula sendo a principal delas a acumulação de vesículas membranosas -derivadas do RE- no

citoplasma para formar os complexos de replicação virais, a desorganização do citoesqueleto celular e a condensação da cromatina no núcleo (Agol *et al.*, 1998).

Além de todos esses efeitos, as proteases 2A e 3C podem provocar a ativação de caspases ocasionando a morte celular por apoptose (Agol *et al.*, 1998; Calandria *et al.*, 2004). Isso reflete mais uma vez a forte citotoxicidade de ambas as proteases. O estudo dessas enzimas virais é crucial para compreender o mecanismo usado pelo vírus para replicar seus genomas e traduzir os RNAm em nível molecular (Castelló *et al.*, 2011).

1.4.1 Protease 2A

A proteína 2A dos picornavírus não possui atividade proteolítica em todos os membros desta família, é uma protease apenas nos enterovírus. As principais ações da protease 2A durante a infecção viral são, além de clivar o segmento P1 da poliproteína, a degradação de nucleoporinas e de um fator de iniciação de tradução eucariótica (eIF4G) (Younessi *et al.*, 2012). É interessante notar que as proteínas estruturais, originadas do intermediário P1, não são necessárias na síntese do RNA viral, ou seja, a protease 2A não é pré-requisito para a replicação dos poliovírus mas sim, para a formação do capsídeo viral (Igarashi *et al.*, 2010).

No início da infecção, a protease 2A inibe a tradução da célula hospedeira ao clivar diretamente um fator de iniciação de tradução eucariótica (eIF4G) ou, de forma indireta, ativando proteases celulares (Zamora *et al.*, 2002). Com isso, a tradução do RNAm celular fica comprometida mas a tradução do RNAm viral não é afetada, ao contrário, ela é favorecida (Etchison *et al.*, 1982; Kuechler *et al.*, 2002). A clivagem desse fator em células infectadas por poliovírus representa um dos principais mecanismos de inibição da tradução celular (Younessi *et al.*, 2012).

Células eucarióticas mantêm seu genoma no núcleo que é envolto por uma bicamada lipídica chamada de envelope nuclear; a única forma de penetrar ou sair do núcleo é através dos poros nucleares presentes em todo o envoltório nuclear e formados por diferentes proteínas chamadas nucleoporinas, ou *Nups*. A protease 2A degrada essas nucleoporinas causando uma alteração na permeabilidade da membrana nuclear, acompanhada da saída de diversas proteínas nucleares endógenas envolvidas na transcrição e tradução celular. A maioria dessas proteínas

deslocadas têm por função se ligar ao RNAm para que este seja traduzido pelos ribossomos celulares (Younessi *et al.*, 2012; Gustin, 2003). Além disso, estudos demonstraram que a protease 2A dos poliovírus induz a fragmentação de DNA e a condensação da cromatina (Goldstaub *et al.*, 2000).

A protease 2A é uma cisteíno protease apesar de possuir a conformação tridimensional de uma quimiotripsina (superfamília das serino proteases). Outra característica peculiar desta enzima é a presença de um íon de zinco (Zn^{2+}) ligado covalentemente à sua extremidade C-terminal, este metal é essencial para a estabilidade e atividade da enzima (**Figura 5**) (Racaniello, 2001; Tong, 2002).

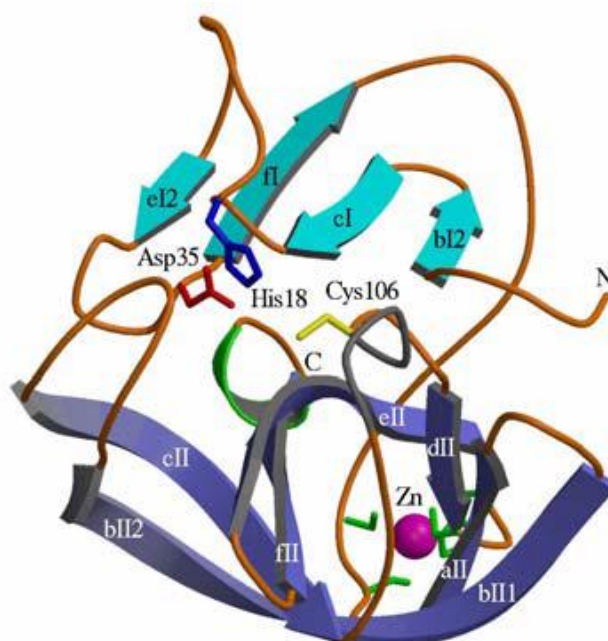


Figura 5. Estrutura tridimensional da protease 2A dos poliovírus. A protease 2A é uma cisteíno protease apesar de possuir a conformação de uma quimiotripsina da superfamília das serino proteases, e tem um íon de Zn^{2+} (esfera roxa) ligado covalentemente (Petersen *et al.*, 1999).

1.4.2 Proteases 3C/3CD

Todos os picornavírus codificam as proteases 3C/3CD e ambas são responsáveis pela grande maioria das clivagens da poliproteína viral. 3CD é precursora da protease 3C e da RNA polimerase viral 3D que são formadas por auto-clivagem. Esta molécula 3CD age como protease sendo responsável pelo processamento do intermediário P1 (precursor das proteínas estruturais), ela possui atividade proteolítica mas não polimerase (Harris *et al.*, 1992; Marcotte *et al.*, 2007). É importante notar que vários intermediários de proteínas virais, como a 3CD, são produtos estáveis e com funções específicas (Buenz & Howe, 2006).

A protease 3C é responsável por clivar fatores de transcrição específicos essenciais para a ação das três classes de RNA polimerase dependente de DNA (RNAPol I, II e III), inativando-as; com isso, há uma rápida inibição da síntese de RNA celular (Chase & Semler, 2012). A clivagem desses fatores de transcrição ocorre no núcleo da célula hospedeira; e a protease 3C penetra no núcleo através de seu precursor 3CD que possui uma sequência de localização nuclear (Amineva *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009).

Assim como a protease 2A, a 3C também é uma cisteíno protease cuja estrutura conformacional se assemelha a de uma quimiotripsina serino-protease (Cameron *et al.*, 2010).

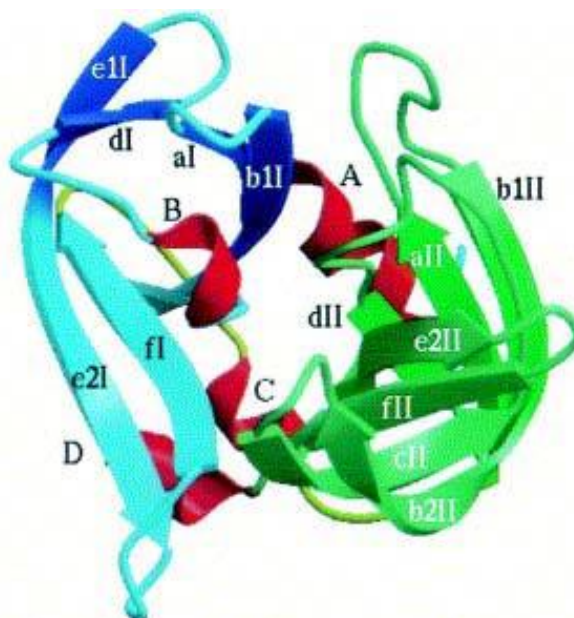


Figure 6. Estrutura da protease 3C dos poliovírus. Assim como a 2A, esta enzima é uma cisteíno protease com conformação de quimiotripsina (Mosimann *et al.*, 1997).

2. Poliomielite

A poliomielite, também conhecida como pólio ou paralisia infantil, é uma doença infecciosa muito contagiosa causada por qualquer um dos três sorotipos de poliovírus. Por ser altamente contagiosa, os poliovírus selvagens infectam praticamente toda a população em áreas endêmicas (Sutter *et al.*, 2004). A poliomielite pode atacar em qualquer idade, mas afeta principalmente crianças menores de cinco anos (OMS, 2012).

A poliomielite é caracterizada por um quadro de paralisia flácida de início súbito, que pode se manifestar de várias formas. A maioria das infecções são inaparentes ou assintomáticas (de 90 à 95% dos casos), embora alguns casos possam desenvolver uma doença menor com sintomas inespecíficos (febre, cefaléia, mal-estar) ou então meningite asséptica (1% dos casos). Apenas uma pequena parcela de indivíduos suscetíveis expostos a um poliovírus selvagem desenvolve a poliomielite paralítica (0,01 à 2%) apresentando o quadro clássico de paralisia flácida aguda. Somente as formas paralíticas possuem características típicas: instalação súbita da deficiência motora, acompanhada de febre e acometendo sobretudo a musculatura dos membros, com mais freqüência os inferiores; flacidez muscular, com diminuição ou abolição de reflexos profundos na área paralisada. A paralisia dos músculos respiratórios e da deglutição implica em risco de vida para o paciente (MS, 2008).

A paralisia poliomiélfítica, que geralmente é assimétrica, avança em poucos dias e, dependendo dos lugares de replicação dos vírus no sistema nervoso central, pode afetar os músculos esqueléticos (poliomielite espinhal), músculos respiratórios (poliomielite bulbar), ou ambos (poliomielite bulbo-espinhal) (Racaniello & Ren, 1996; Sutter *et al.*, 2004).

2.1 Transmissão e Patogenia

A transmissão dos poliovírus ocorre principalmente por contato direto pessoa a pessoa, pela via fecal-oral (a principal), por objetos, alimentos e água contaminados, ou pela via oral-oral, através de gotículas de secreções da orofaringe (ao falar, tossir ou espirrar). As más condições habitacionais, a higiene pessoal precária e o elevado

número de crianças em uma mesma moradia constituem fatores que favorecem a transmissão do vírus (MS, 2009).

Após penetrar no organismo pelo trato respiratório superior, o poliovírus inicia sua replicação nas mucosas da orofaringe e do intestino, onde atinge a corrente sanguínea através dos linfonodos, resultando na viremia primária. A maioria das infecções por poliovírus não passa desse estágio, sendo assintomáticas (Racaniello, 2006). Uma vez no sangue, o vírus é capaz de se difundir por todo o organismo e pode, raramente, penetrar no sistema nervoso central (SNC), entre outras estruturas, onde a replicação dos poliovírus provoca a viremia secundária associada à sintomas clínicos (**Figura 7**) (Rotbart & Kirkegaard, 1992; Stalkup & Chilukuri, 2002).

A invasão do SNC pelo poliovírus é chamada de etapa neurológica e ocorre em um em cada mil casos. Nesta etapa acontece a proliferação intraneural dos vírus, a replicação viral acontece nos neurônios motores podendo provocar meningite asséptica ou, em menor proporção, poliomielite parálitica; o quadro clínico vai depender do número de neurônios motores atingidos. A doença aguda, com intensas manifestações de comprometimento do sistema nervoso, pode se apresentar após uma fase inicial, com febre, dor de cabeça, dor de garganta, vômitos e às vezes rigidez de nuca, ou pode se instalar de repente (Racaniello, 2006; De Jesus, 2007). Como a paralisia só ocorre em uma minoria dos infectados, a poliomielite é definida como uma doença que acidentalmente, e raramente, atinge os neurônios motores (Racaniello, 2006).

O período de incubação (entre a infecção e o surgimento das manifestações clínicas) é geralmente de 7 a 12 dias, podendo variar de 2 a 30 dias (MS, 2009). Em geral, a doença se manifesta ao redor do décimo dia após a exposição ao vírus. Os vírus são excretados nas fezes por volta de 30 dias após o início da doença, e estão presentes na faringe por uma ou duas semanas após a infecção; isto ocorre tanto nos indivíduos com sintomas como nos indivíduos com infecção subclínica (Da Silva *et al.*, 2005).

Não se conhece com exatidão o período de transmissibilidade do poliovírus, ele pode iniciar-se antes do surgimento das manifestações clínicas, sendo o vírus encontrado nas secreções da orofaringe após 36 a 72 horas a partir da instalação da infecção. Em indivíduos infectados, a eliminação do vírus pela orofaringe persiste por um período de aproximadamente uma semana e nas fezes por cerca de 3 a 6 semanas (MS, 2009).

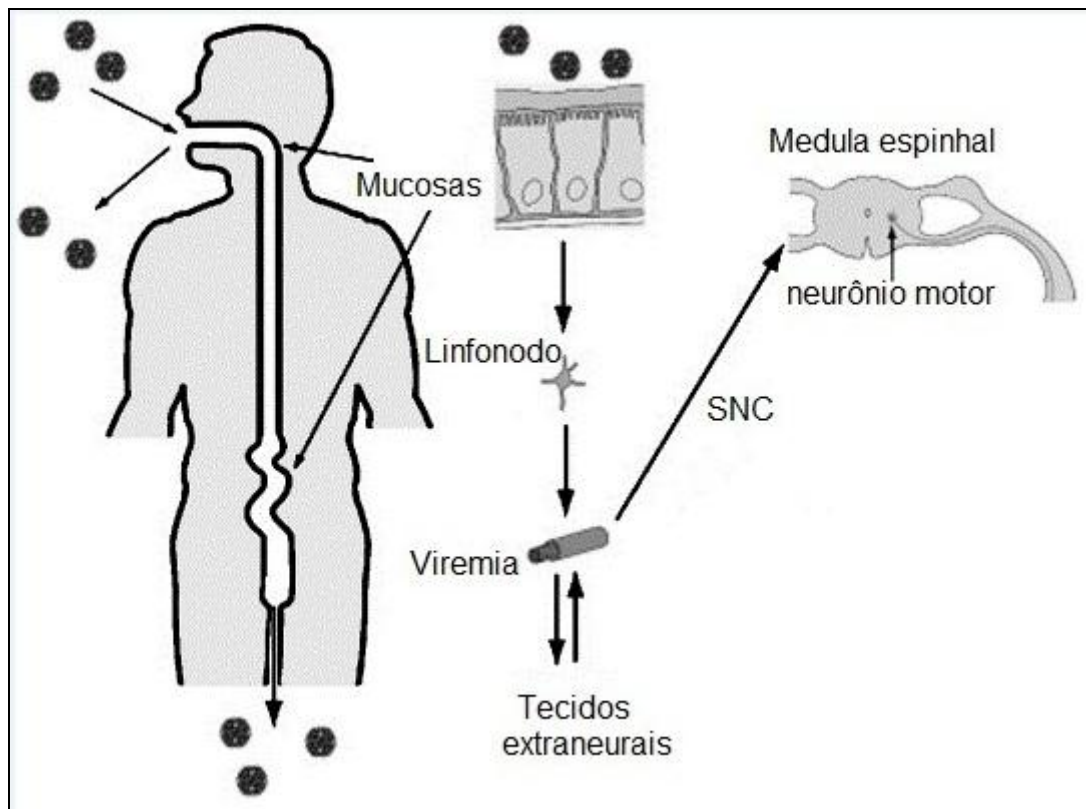


Figura 7. Patogenia dos poliovírus. O poliovírus penetra no organismo pela via oral e se replica inicialmente nas mucosas da faringe e do intestino. Em seguida, ele atinge a corrente sanguínea (viremia) através dos linfonodos podendo se difundir para o sistema nervoso central (SNC) ou para tecidos extraneurais. Ao invadir o SNC, o poliovírus se replica nos neurônios motores podendo causar sintomas graves. Os neurônios motores podem estar situados na medula espinhal, no tronco cerebral, ou então, no córtex motor. A saída dos vírus pode ser pela via oral, mas a principal forma de transmissão é com a saída pela via fecal.

Figura adaptada de Racaniello, 2006.

2.2 Vacinas

O poliovírus é o único enterovírus contra o qual existe vacina disponível. Embora boas condições sanitárias e de higiene ajudem a limitar sua disseminação, a única prevenção específica para a poliomielite é a imunização através da vacina oral atenuada trivalente para pólio (OPV) e/ou a vacina inativada (IPV) (Melnick, 1996). Ambas as vacinas são seguras e eficazes, cada uma com suas vantagens e desvantagens, (Melnick, 1978) e ambas conferem proteção frente aos 3 sorotipos dos poliovírus (CDC, 2006).

2.2.1 IPV -Vacina inativada ou Salk

Esta vacina foi desenvolvida pelo Dr Jonas Salk em 1955. A IPV confere imunidade humoral satisfatória, mas não induz a imunidade local (intestinal) fazendo com que o vírus selvagem ainda consiga se multiplicar no trato intestinal de pessoas vacinadas. A ausência de vírus vivo nesta vacina a torna mais segura, podendo ser administrada em pessoas portadoras de imunodeficiências além de possibilitar sua incorporação à outros tipos de vacinas injetáveis necessárias na infância tal como a DPT (difteria-tétano-pertussis). Uma de suas maiores vantagens é a de não introduzir na comunidade qualquer vírus vivo que poderia ser espalhado de forma não-controlada, ou ainda sofrer mutações. Outras desvantagens desta vacina são o seu alto custo, a necessidade de mais de uma dose, além de falhas técnicas na inativação poderem levar a surtos (Moore & Morens, 1984; Moldin, 1995; Melnick, 1996).

2.2.2 OPV - Vacina atenuada ou Sabin

A vacina oral de vírus atenuado foi desenvolvida pelo Dr Albert Sabin em 1961. A OPV tem sido mais largamente usada devido a alguns fatores como: grande facilidade em sua administração pela via oral, baixo custo, capacidade em induzir a produção de anticorpos não apenas séricos mas também uma resistência intestinal, e rapidez com que as pessoas vacinadas desenvolvem uma longa imunidade. Os vírus vacinais são excretados abundantemente pelos indivíduos vacinados e se espalham para outras pessoas e para o meio ambiente, imunizando desta forma pessoas não-vacinadas. A desvantagem da vacina atenuada é a possibilidade de mutações que resultam em casos da doença associados à vacina; ela é também contra-indicada para pessoas imunodeficientes. Outro problema desta vacina é o sistema de transporte a frio, especialmente nas regiões tropicais, já que o vírus só pode ser transportado em condições de baixas temperaturas para permanecer viável (Moore & Morens, 1984; Melnick, 1996).

A elaboração de vacinas eficazes para prevenir a poliomielite parálitica foi um dos grandes avanços médicos do século 20. Com o desenvolvimento da vacina oral bivalente, em 2009, o Fundo Global de Erradicação da Pólio tem atualmente um

arsenal de cinco vacinas diferentes para interromper a transmissão da pólio: OPV, IPV, vacinas monovalentes orais da poliomielite (mOPV1 em OPV3); vacina bivalente oral contra a poliomielite (bOPV).

Se muitas pessoas em uma comunidade forem imunizadas, o vírus será privado de hospedeiros suscetíveis e não conseguirá se propagar. Altos níveis de cobertura vacinal devem ser mantidos para evitar a transmissão e prevenir a ocorrência de surtos. O Fundo Mundial para a Erradicação da Pólio está constantemente avaliando a melhor utilização das diferentes vacinas para prevenir a poliomielite parálitica e para interromper a transmissão do poliovírus nas diferentes áreas do mundo (OMS, 2012).

2.2.3 Poliovírus vacinais derivados (VDPV)

Poliovírus vacinais derivados (VDPV) são cepas raras de poliovírus que sofreram mutações genéticas a partir da cepa contida na vacina oral atenuada. Quando uma criança é vacinada com a OPV, o vírus vacinal passa pelo mesmo caminho do vírus selvagem, ele se replica no intestino e penetra na corrente sanguínea, sendo excretado principalmente pelas fezes. Com isso, a criança desenvolve uma ótima resposta imune e uma resistência intestinal, e ainda excreta vírus vacinal por um período de 6 a 8 semanas. Os poliovírus vacinais excretados podem ter passado por mutações durante a replicação no organismo e passam a ser diferentes do vírus vacinal original da OPV. Esses vírus vacinais diferentes geneticamente são os VDPV. Os poliovírus vacinais derivados podem, muito raramente, causar paralisia. A poliomielite parálitica associada à vacina (VAPP) ocorre dentro de uma estimativa de 1 caso para cada 2,7 milhões de doses aplicadas. É importante ressaltar que a distinção entre as cepas selvagens e as vacinais não se baseia na neurovirulência. (OMS, 2012).

2.3 Epidemiologia

Os poliovírus podem circular indefinidamente em populações humanas suscetíveis sendo capazes de infectar 100% dos indivíduos. O homem é o único reservatório natural dos poliovírus que são transmitidos principalmente por pessoas com infecções inaparentes. A contaminação fecal, através das mãos, talheres e alimentos, é a fonte mais frequente de contaminação (fecal-oral). É por esta razão que crianças de baixa idade, ainda sem hábitos de higiene desenvolvidos, estão particularmente sob risco. Grandes quantidades de vírus infecciosos são excretados nas fezes de todos os contaminados, sejam eles assintomáticos ou sintomáticos.

Antes da era da vacina, a pólio era uma doença sazonal nas áreas de clima temperado, as infecções por poliovírus aconteciam preferencialmente no verão provocando picos de casos nesta estação. Já nas regiões de clima tropical, não havia um padrão sazonal e a infecção se mantia em níveis iguais durante todo o ano (Serfling & Sherman, 1953; CDC, 2009).

Em suma, os maiores fatores de risco para a transmissão do poliovírus incluem a falta de saneamento e de higiene, condições tropicais e subtropicais, e elevada densidade populacional (Nathanson & Martin, 1979; Sabin AB, 1985).

Do ponto de vista da história da medicina, a epidemiologia da poliomielite fornece um ótimo caso de estudo, intrigante e instrutivo ao mesmo tempo. Cada etapa da história dessa doença foi imprevisível no momento de sua ocorrência, e bem documentada. Primeiramente, a poliomielite apareceu sob a forma epidêmica no final do século 19 em muitos países europeus e da América do Norte. Logo em seguida, a doença tornou-se rapidamente endêmica globalmente e, com a criação de vacinas (a partir de 1955), encontra-se hoje praticamente erradicada do mundo (Nathanson & Kew, 2010).

2.4 Erradicação

A poliomielite paralítica é conhecida no mundo há, pelo menos, 3500 anos (Paul, 1971) e já foi de alta incidência no Brasil e em outros países, deixando centenas de indivíduos com sequelas paralíticas (MS, 2008). Hoje, a poliomielite é doença rara em todos os países desenvolvidos, e quase na totalidade dos países em desenvolvimento. Este sucesso é atribuído à utilização sistemática da OPV,

desenvolvida pelo Dr. Albert Sabin, dentro do Programa de Erradicação da Poliomielite da OMS (Kew *et al.*, 1993).

A era da vacina começou na Europa, na América do Norte e na Oceania em 1955 com a introdução da IPV, firmando-se após 1960, com o advento e a utilização da OPV em larga escala. Raramente uma doença grave havia sido controlada tão rapidamente; em 12 anos (de 1955 à 1967) houve uma redução de 76.000 para 1.013 casos de poliomielite nas regiões citadas, o que correspondeu a uma queda de 99% do número de casos (Gonçalves, 2008; Nathanson & Kew, 2010).

Durante a década de 1980, os níveis de cobertura vacinal, com o uso da OPV, atingiram uma taxa mundial ao redor de 85%. Em 1980, o Brasil iniciou as campanhas em massa com a utilização da OPV (Risi, 1984). Em 1989, registrou-se o último caso de poliomielite no país, após um período de realização de grandes campanhas vacinais e intensificação das ações de vigilância epidemiológica (MS, 2008). Com base no sucesso obtido no Brasil, a Organização Panamericana de Saúde (PAHO) lançou em 1985 o seu Programa de Erradicação Regional, estabelecendo a meta de se erradicar os poliovírus selvagens da região das Américas até o ano de 1990. O último vírus selvagem detectado na região das Américas ocorreu no Peru em 1991; este vírus foi isolado, identificado e caracterizado no laboratório de Enterovírus da Fiocruz (Da Silva *et al.*, 2005). Em 1994, o poliovírus selvagem foi considerado erradicado do Brasil e das Américas recebendo um certificado da erradicação da poliomielite (MS, 2008).

O sucesso da erradicação nas Américas serviu de base para o Programa Global de Erradicação da Poliomielite (GPEI) estabelecido pela OMS, em 1988, durante a resolução da Assembléia Mundial da Saúde. Este programa representa hoje a maior, mais duradoura e mais custosa iniciativa de saúde coordenada internacionalmente na história. Em 1988, os poliovírus selvagens estavam circulando ininterruptamente em grande parte do mundo, com uma estimativa de 350.000 casos de poliomielite paralítica ocorrendo em mais de 125 países endêmicos (CDC, 2004). Graças à cooperação de mais de 200 países e milhões de voluntários, apoiados por um investimento internacional de mais de US\$ 8 bilhões, o número de casos da doença no mundo diminuiu em mais de 99% até o ano 2000 e milhões de crianças que teriam sido paralisadas estão hoje andando. Em 2005, restavam apenas quatro países endêmicos que nunca interromperam a transmissão de poliovírus selvagem: a Índia, a Nigéria, o Paquistão e o Afeganistão. Atualmente, são só 3 já que a Índia

teve seu último caso em janeiro de 2011 (**Figura 8**) (OMS, 2012; Nathanson & Kew, 2010). Atualizações regulares sobre o progresso para erradicação global da poliomielite são postados no site da OMS (<http://www.polioeradication.org/>).

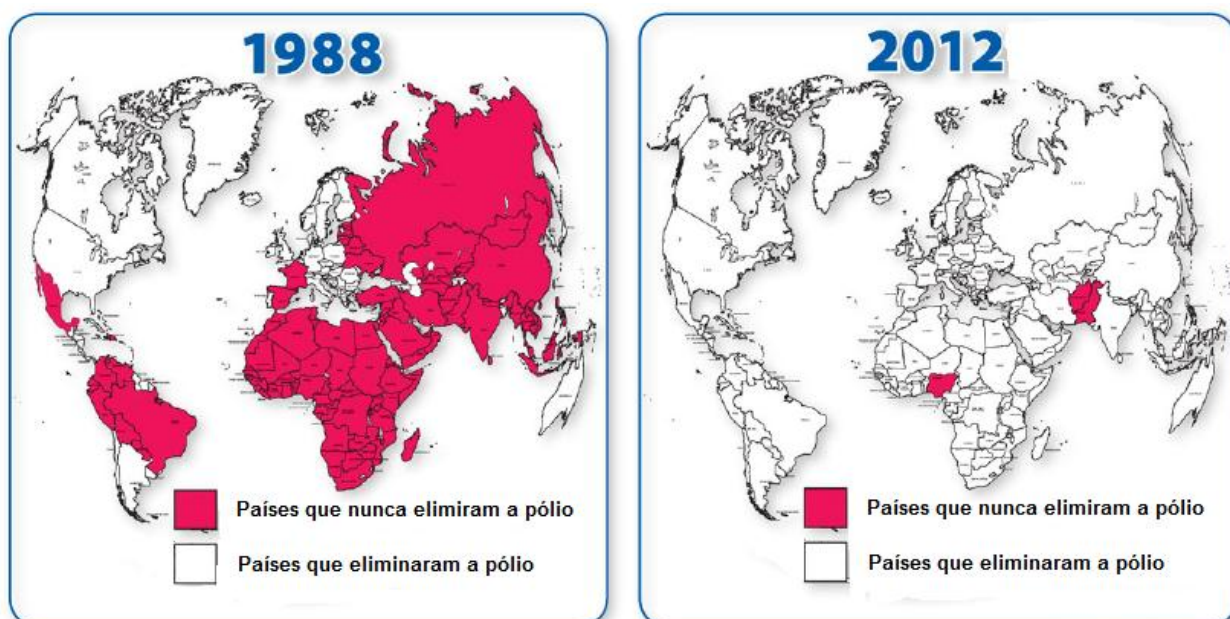


Figura 8. Áreas endêmicas de poliovírus selvagem em 1988 e em 2012.

Em 1988, o número de países endêmicos para pólio era 125. Graças ao Programa Global de Erradicação da Poliomielite estabelecido naquele ano, esse número caiu para apenas 3 em 2012: a Nigéria, o Paquistão e o Afeganistão.

Figura retirada de <http://www.cdc.gov/polio/progress>.

2.5 Desafios da erradicação

Quando a OMS implantou o GPEI em 1988, o objetivo era que essa doença fosse erradicada no mundo inteiro até o ano 2000. O projeto se mostrou bem sucedido ao passo que os casos de paralisia infantil diminuíram em 99% desde os anos 80. Infelizmente, a erradicação mundial nunca aconteceu e os poucos países que ainda não erradicaram a doença representam um grande risco e ameaça para o resto do mundo livre de pólio. A dificuldade da erradicação total da pólio se explica por diversos motivos, sendo os principais: o insucesso em imunizar toda a população (os países que continuam endêmicos nunca atingiram 100% de cobertura vacinal), a falha da vacina e a epidemiologia do vírus. Os países que ainda não erradicaram o vírus selvagem possuem os maiores fatores de risco para a

transmissão do poliovírus que são: o saneamento precário, climas tropicais e subtropicais, e elevada densidade populacional (Nathanson & Kew, 2010).

Atualmente, apenas o Afeganistão, a Nigéria e o Paquistão nunca tiveram a pólio erradicada. Além destes, existem países em que a transmissão da pólio foi restabelecida e se mantém ativa há mais de 12 meses na sequência de uma importação. E ainda há os países que estão passando por surtos com poliovírus importados dos países endêmicos (OMS, 2012). Os casos do últimos 3 anos estão ilustrados a seguir, na **Figura 9**.

Em cada um dos países que ainda não erradicaram a pólio existem diferentes desafios, ou combinações de fatores, que culminaram nos baixos níveis da imunidade populacional. Conseqüentemente, estratégias específicas devem ser adotadas para cada situação. Cada um desses 3 países possui regiões de difícil acesso, seja por questões geográficas, ou por questões de segurança devido a conflitos étnicos e/ou religiosos que dificultam a imunização de toda a população local (Aylward & Tangermann, 2011).

A taxa de cobertura vacinal no Afeganistão é de 66%, e no Paquistão de 75%. A não erradicação da pólio nesses países é devida, em parte, às áreas de conflitos existentes em ambos os países já que essas áreas se tornam inacessíveis para as atividades de combate à pólio. Para o sucesso do Programa de Erradicação da Pólio, esses países devem encontrar uma forma de aumentar a segurança das equipes de vacinação nas áreas de conflitos pois muitos já foram mortos na tentativa de imunizar crianças dessas áreas. Em outras regiões de conflito, como a República Democrática do Congo ou a Somália, adotava-se regularmente “dias de tranquilidade” em que não havia nenhum tipo de combate permitindo a ação das equipes de vacinação, a pólio foi erradicada dessas nações. O mesmo não ocorre no Afeganistão nem no Paquistão, onde as revoltas e lutas religiosas continuam sem trégua (CDC, 2012; Aylward & Tangermann, 2011).

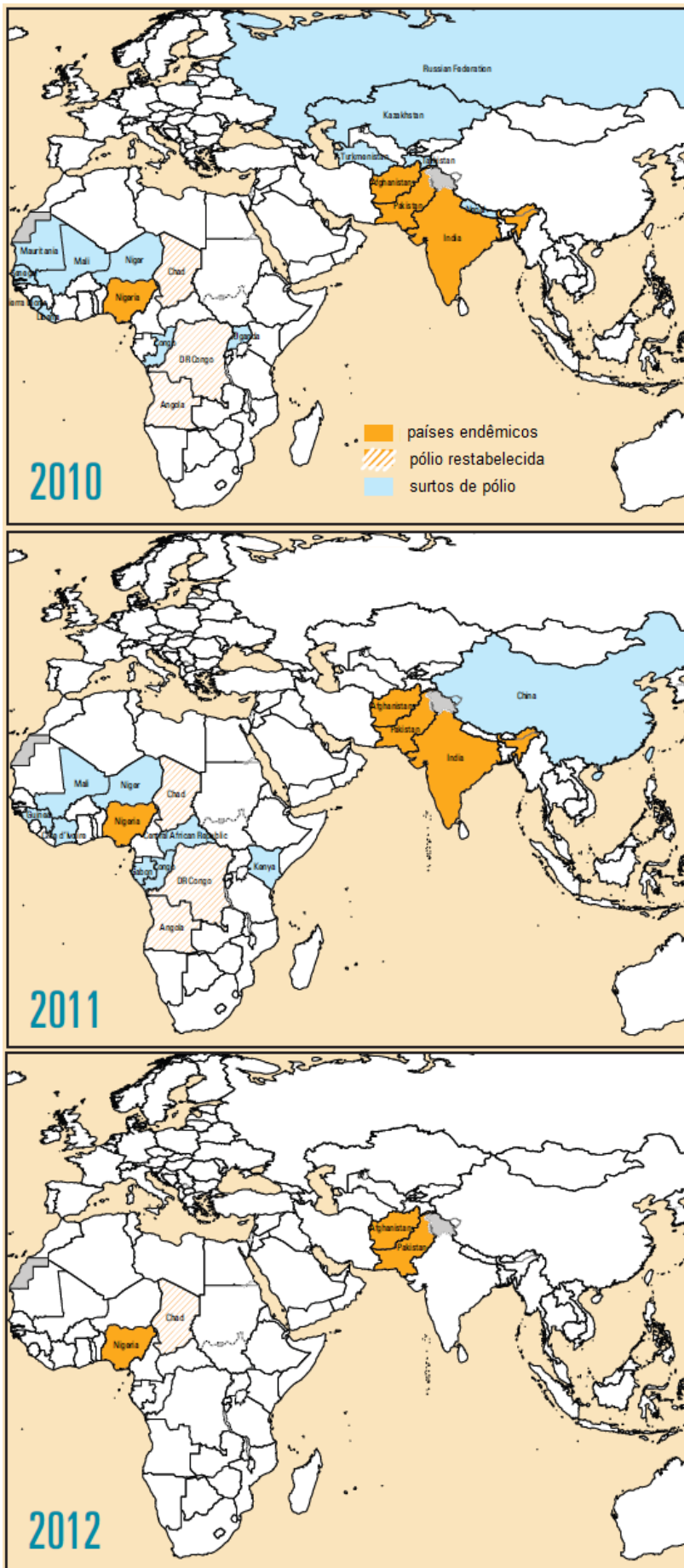


Figura 9. Diminuindo o território da Pólio.

Desde 2010, quase todos os países com surtos ou com importação de poliovírus selvagem dos países endêmicos foram controlados. Em 2012, os casos de pólio foram os menores já registrados, com apenas uma ocorrência por importação no Chad (listrado). (Roberts, 2012; OMS, 2012).

Na Nigéria, a taxa de vacinação de crianças é por volta de 65% e, apesar de também existirem áreas de risco e conflito, o maior problema nesse país (que também é o mais populoso do continente africano) é a fraca infraestrutura do sistema de saúde e as limitações em planejar e implementar as ações de imunização. Além disso, grande parte da população nigeriana perdeu a confiança na OPV após falsos rumores sobre a segurança dessa vacina ocorridos em 2003, durante um surto de pólio na região. Esses rumores alegavam que a vacina deixava estéril, e o uso da OPV foi suspenso em grande parte do país, um dos estados nigerianos (Kano) chegou a ficar 12 meses completos sem imunizar crianças contra a pólio causando diversos surtos e casos de poliovírus importado nos países vizinhos (CDC, 2011; Aylward & Tangermann, 2011).

Outra grande preocupação são as populações nômades que se encontram dentro ou próximas aos países pólio-endêmicos. Atualmente tornou-se claro que os povos nômades constituem um dos últimos reservatórios dos poliovírus selvagens e eles aumentam constantemente as chances de surtos por importação do vírus. O programa de erradicação já definiu diversas formas de tentar alcançar essas populações como imunizações em estações de trens ou ainda mandar a equipe de vacinação em barcos.

Em junho de 2012, os casos de pólio foram os menores já registrados, dando grandes esperanças ao programa de erradicação que passou por quase uma década de estagnação. Infelizmente, esses ganhos são frágeis e o insucesso continua sendo uma possibilidade real (Roberts, 2012).

Por enquanto, o principal objetivo da GPEI continua sendo acabar com a circulação do poliovírus selvagem tentando vacinar a maior quantidade possível de crianças. Além disso, deve haver uma transição da OPV para a IPV nos países livres dessa doença para eliminar os casos de paralisia poliomiélica associada à vacina (VAPP) e para reduzir os riscos de aquisição de vírus selvagem, seja por importação ou por viagens internacionais (Nathanson & Kew, 2010). Até que a pólio seja erradicada, as importações podem ocorrer em qualquer país do mundo e, por isso, é necessária a manutenção não só de altas taxas de cobertura vacinal mas também de vigilância virológica de casos de paralisia flácida aguda, mesmo em países livres de poliovírus selvagens, como o Brasil.

O papel da rede de laboratórios é de enorme importância no sentido da certificação da erradicação da poliomielite. Esta rede global de laboratórios inclui o laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) que é classificado como referência das Américas, segundo os critérios da OMS (CDC, 1997).

3. Antivirais

As doenças e moléstias causadas por vírus têm sido motivo de preocupação para a humanidade há séculos. A vacinação possibilita a prevenção de algumas infecções virais como a hepatite B, a febre amarela e a poliomielite, entre outras, além de já ter levado à erradicação da varíola. A terapia antiviral é fundamental para o monitoramento das infecções que não podem ser controladas por vacinação, mas também é importante para as infecções cuja vacinação não tenha sido implementada ou não tenha alcançado a proteção pretendida (De Clercq, 2013). Atualmente existe um número limitado de antivirais frente ao grande número de viroses que afetam as populações, sendo que a maioria dos antivirais existentes é destinada ao tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (OMS, 2008).

A falta de drogas antivirais efetivas deve-se principalmente ao fato de que os vírus são absolutamente dependentes das vias metabólicas da célula hospedeira para sua replicação. Assim, a maioria dos agentes que bloqueiam a replicação viral é letal ou prejudicial para as células (De Clercq, 2002). No entanto, com o aumento do conhecimento sobre a replicação viral, o desenvolvimento de drogas que atuam sobre proteínas virais sem afetar o metabolismo celular tem avançado bastante (White & Fenner, 1994). A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos antivirais são essenciais devido à existência de uma enorme quantidade de vírus ainda sem tratamento eficaz, aos efeitos colaterais causados por antivirais existentes e ao surgimento de resistência (Milroy & Featherstone, 2002).

Para que uma droga com potencial antiviral seja liberada para uso em seres humanos, há necessidade de vários anos de estudo. As pesquisas são divididas em duas fases: pré-clínica e clínica. Inicialmente, a nova droga passa pela fase pré-clínica, sendo submetida a testes em laboratório, onde são utilizadas culturas de células mantidas *in vitro*, visando à avaliação da atividade citotóxica e antiviral. O presente trabalho avalia justamente essa etapa da fase pré-clínica. Em seguida são determinados os mecanismos celulares de ação da droga. Obtendo bons resultados nos quesitos anteriores, os estudos prosseguem com animais, etapa esta que demora de três a quatro anos. Em seguida, ocorre a fase clínica com testes em seres humanos (Wigg, 2008).

Um composto antiviral ideal deve ser: (i) facilmente administrado, sendo a melhor forma a oral ou qualquer uma que dispense a atividade de um profissional de saúde; (ii) de ação rápida; (iii) eficaz e seguro, independentemente da competência imunológica, podendo ser utilizada em pessoas imunodeprimidas; (iv) econômico; (v) estável; (vi) facilmente estocado já que moléculas antivirais não são compostos biológicos então não há grandes exigências para seu armazenamento e (vii) rapidamente distribuído pois não precisam de condições especiais de transporte (Collett *et al.*, 2008; De Palma *et al.*, 2008).

3.1 Antivirais para poliovírus

A erradicação da pólio está em vias de obter sucesso; com esse objetivo, a Iniciativa Global de Erradicação à Pólio tem contado quase que exclusivamente com o uso da OPV nas últimas décadas. Infelizmente, conforme a erradicação se aproxima, o uso da OPV torna-se cada vez mais insustentável devido à ocorrência de poliomielite parálitica associada à vacina e doenças causadas por poliovírus derivado da vacina por causa de uma reversão da neurovirulência do vírus atenuado. Uma vez que a transmissão do poliovírus selvagem for interrompida globalmente, também deverá ser interrompido o uso da OPV. Com isso, teremos apenas a IPV como única arma para defender um mundo livre de pólio. Surtos são esperados após a cessação da OPV e existem grandes dúvidas quanto à habilidade da IPV em controlar esses surtos devido a todas suas desvantagens (ver seção 2.1 vacinas). Sendo assim, uma comissão organizada à pedido da OMS e do CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças) concluiu que o desenvolvimento de antivirais contra o poliovírus é uma etapa fundamental para finalizar a erradicação mundial da pólio. Em um mundo livre de pólio, compostos anti-poliovírus seriam usados para tratar indivíduos imunocomprometidos que podem se tornar excretoras de cepas à longo prazo mas também para proteger aqueles expostos ao poliovírus (como os profissionais de saúde em laboratórios ou comunidades expostas à circulação de poliovírus derivado da vacina), agindo rápido para conter um surto e sendo utilizado como um complemento da IPV (Couzin, 2006; Collett *et al.*, 2008; Norder *et al.*, 2011).

Um composto antiviral ideal para poliovírus deve, além de possuir as sete características citadas na seção anterior, manifestar uma ampla atividade em

relação às diferentes cepas virais assim como ser excessivamente seguro, sem demonstrar nenhum sinal de genotoxicidade, mutagenicidade, cardiotoxicidade, entre outros. O desenvolvimento de novos agentes antivirais se baseia nas etapas específicas do ciclo replicativo viral ou em modificações dos antivirais já existentes. Ainda são muito poucos os estudos voltados para a ação antiviral especificamente contra os poliovírus, então as linhas de pesquisa existentes se baseiam bastante sobre o atual conhecimento dos antivirais contra os picornavírus (Collett *et al.*, 2008; De Palma *et al.*, 2008).

A investigação de drogas antivirais contra picornavírus tem sido focada quase que exclusivamente nos enterovírus devido ao potencial deles em causar grandes surtos ou infecções crônicas. O desenvolvimento desses compostos pode ser facilitado quando mais estruturas das proteínas virais terão sido determinadas (Norder *et al.*, 2011). Como já mencionado, os picornavírus formam uma grande família de patógenos que afetam tanto humanos quanto animais. Apesar do enorme impacto clínico, ainda não existem antivirais aprovados para tratamentos de infecções por picornavírus (De Palma *et al.*, 2008a, b, c).

Em 2006 foi estabelecida a Iniciativa de Antivirais para Poliovírus cujo objetivo principal é de determinar se compostos candidatos à antivirais são seguros e capazes de prevenir, reduzir ou acabar com a excreção de poliovírus em adultos que tomaram a OPV (De Palma *et al.*, 2008). A recomendação é de desenvolver no mínimo dois antivirais com mecanismos distintos de ação (Couzin, 2006; Collett *et al.*, 2008) pois há uma grande probabilidade da emergência de variantes resistentes a novas drogas antivirais devido às altas taxas de mutação dos enterovírus. Uma forma de prevenir ou atrasar este fato é usar combinações de compostos com diferentes alvos do ciclo viral (Norder *et al.*, 2011). As principais drogas em estudo incluem os inibidores de capsídeo e os de proteases (OMS, 2012).

Os inibidores de capsídeos representam a classe de antivirais mais extensamente estudada nos picornavírus e atuam bloqueando a adsorção viral e, portanto, impedindo a entrada do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira. Em relação aos inibidores de proteases, os mais estudados são os voltados na inibição da 3C pois esta protease é comum a todos os membros da família *Picornaviridae* sendo sempre responsável pela maioria das clivagens da poliproteína viral. Além de ser essencial na replicação e na maturação viral, a proteína 3C é bastante conservada em toda esta família apresentando uma estrutura bem

diferente das proteases celulares conhecidas; tudo isso torna 3C um grande alvo dos estudos antivirais (Collett *et al.*, 2008; Baxter *et al.*, 2010). A protease 2A é altamente conservada nos enterovírus e rinovírus e diversas substâncias já foram identificadas como potenciais inibidores dessas proteases (Chen *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de um antiviral contra pólio tem grandes probabilidades de sucesso, há numerosos e excelentes pontos de partida que poderiam permitir a elaboração rápida e economicamente viável desses compostos. Tendo em vista a iminência da erradicação da pólio, o tempo de ação é agora. Uma grande questão é como mobilizar recursos necessários e estimular o interesse farmacêutico para o desenvolvimento desses antivirais que serão usados principalmente em países do terceiro mundo ou em casos esporádicos. Infelizmente, até hoje, nenhum antiviral para poliovírus foi aprovado (Collett *et al.*, 2008, De Clercq, 2013).

JUSTIFICATIVA

O trabalho da Iniciativa Global de Erradicação da Pólio não vai acabar uma vez que a poliomielite for erradicada. A manutenção de atividades será necessária para minimizar os riscos de reintrodução do poliovírus e da emergência de circulação do poliovírus derivado da vacina (cVDPV). A fim de se preparar para a gestão destes riscos, o Fundo Global de Erradicação da Pólio tem um programa com várias frentes de trabalho dentre as quais encontram-se a pesquisa, a formulação de estratégias e o desenvolvimento de políticas, entre outros.

A pesquisa é um componente vital da GPEI, fornecendo os elementos necessários para guiar os passos finais para um mundo livre de pólio. O programa de pesquisa tem como objetivo identificar, desenvolver e avaliar novas ferramentas e abordagens adaptadas para maximizar o impacto dos esforços de erradicação. As áreas de pesquisa atuais incluem diferentes tópicos como: otimização da eficácia e da distribuição da OPV, o desenvolvimento de IPV mais acessível, o gerenciamento dos riscos associados ao poliovírus derivado e os antivirais, dentre outros.

O estudo de antivirais explora o papel de um tratamento antiviral para proteger as pessoas em um mundo livre de poliomielite após a erradicação. Há três situações previstas para o uso de drogas antivirais pólio: (i) para pessoas imunodeficientes que estão cronicamente excretando o poliovírus, (ii) para as pessoas expostas ao vírus, por exemplo, através da exposição involuntária de laboratório e (iii) para as comunidades expostas à circulação do cVDPV na era pós-erradicação (provavelmente em conjunto com a IPV).

Em 2006, a iniciativa de antivirais contra o Poliovírus foi estabelecida. Seu objetivo imediato era determinar se as drogas antivirais candidatas eram seguras e capazes de prevenir, diminuir ou parar a disseminação de poliovírus em adultos que receberam a vacina oral contra a poliomielite. As drogas candidatas para antivirais em estudo incluem inibidores do capsídeo viral e inibidores da protease (OMS - The Global Polio Eradication Initiative, 2012).

O desenvolvimento de antivirais contra os poliovírus é considerado uma condição necessária para o êxito da erradicação mundial da pólio (Couzin, 2006). Portanto é de extrema importância a pesquisa e o desenvolvimento de antivirais contra a pólio, além de ser fortemente apoiada pela OMS.

As substâncias testadas neste trabalho são pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico e correspondem a moléculas quimicamente definidas que foram sintetizadas pelo grupo do professor Joaquim Mendes da Silva, no laboratório de Química Medicinal do Pólo de Xistoquímica (PXQMed) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os pseudopeptídeos foram desenvolvidos racionalmente, de acordo com o alvo viral, para inibir especificamente a serino protease NS3 do vírus da hepatite C (HCV). Além do desenvolvimento das moléculas, este grupo também realizou a avaliação farmacológica destes em parceria com outros laboratórios da UFRJ, frente à inibição da protease do HCV, do vírus da Dengue tipo 2 (DENV-2) e do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

O teste dos pseudopeptídeos neste trabalho representa um projeto em parceria com este grupo da UFRJ, no intuito de avaliar a atividade das moléculas em mais um grupo de vírus, os poliovírus. A escolha em testar esses compostos decorre da forte semelhança estrutural encontradas nas proteases do HCV e dos poliovírus, além de uma dessas moléculas ter apresentado uma boa atividade antiviral sobre o HCV.

OBJETIVO

1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é analisar a possível atividade antiviral de sete pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico sobre a replicação dos poliovírus.

2. Objetivos específicos

- (i) Avaliar a atividade citotóxica das moléculas sobre culturas celulares e definir as faixas de concentração não-tóxicas às células. Os tipos celulares utilizados foram RD e L20B segundo recomendação da OMS.
- (ii) Analisar o efeito antiviral das moléculas em células previamente infectadas com poliovírus.
- (iii) Analisar o efeito antiviral das moléculas em células quando adicionadas antes da infecção por poliovírus.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultura de células

A metodologia utilizada especificamente quanto à pólio é baseada no manual de laboratório de Pólio da OMS (OMS, 2004). A OMS recomenda que todas as amostras suspeitas de conter o poliovírus devam ser inoculadas em duas linhagens de células: células L20B, uma linhagem de células de camundongos geneticamente modificadas que expressam o receptor humano do poliovírus, e células RD que são células diplóides derivadas de rabdiossarcoma embrionário humano – células sensíveis ao isolamento de poliovírus. A seleção de apenas duas linhagens de células para o diagnóstico laboratorial da poliomielite permite a padronização das técnicas e a comparação dos resultados entre os diferentes laboratórios de vírus do mundo, proporcionando uma alta sensibilidade para detecção de poliovírus. As células foram fornecidas pelo CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, USA) ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz/RJ.

As células foram crescidas em garrafas plásticas descartáveis de 75 cm² e mantidas em estufa a 37 °C por 48 horas. Para a manutenção das culturas celulares, monocamadas confluentes foram repicadas utilizando-se o seguinte procedimento: inicialmente, as células foram lavadas com tampão PBS 1x (solução salino-fosfato). Em seguida, desprezou-se o tampão e adicionou-se tripsina a 0,25% diluída em PBS com EDTA a 0,1 M. A solução de tripsina permaneceu em contato com a monocamada celular até que esta se desprendesse da parede da garrafa. Logo após, as células foram homogeneizadas com meio mínimo essencial de Eagle com salina Earle's (Eagle-MEM) contendo 5% de soro fetal bovino, antibióticos e antimicóticos. Posteriormente, 2 mL dessa suspensão celular foi colocado em uma nova garrafa estéril e acrescentou-se 18 mL de meio de cultura de crescimento, específico para cada linhagem celular. A formação da monocamada celular completa ocorre cerca de 48 horas depois, sendo observada no microscópio invertido.

2. Vírus

Os vírus foram produzidos em células RD infectadas com o vírus estoque padrão. O inóculo viral foi diluído em meio de cultura e a adsorção foi realizada durante 45 minutos, a 37°C. Após este período, o meio foi descartado, as células foram lavadas com PBS para remoção das partículas não-adsorvidas, e meio novo foi adicionado à cultura. Cerca de 24 a 48 horas após a infecção, com efeito citopático já avançado (definido pelo aspecto da monocamada em microscopia ótica), o sobrenadante foi coletado em 2 tubos de 15mL, sempre mantidos em gelo. Os tubos foram centrifugados a 8°C por 10 minutos em uma velocidade de 4500 rpm para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante contendo o vírus foi então aliquoteado e estocado à -70°C. Foram utilizados os poliovírus tipo 1 e 2 previamente titulados.

3. Moléculas

As moléculas foram sintetizadas e cedidas pelo grupo do professor Joaquim Mendes da Silva do Laboratório de Química Medicinal do Pólo de Xistoquímica (PXQMed), Departamento de Química Orgânica no Instituto de Química da UFRJ. As moléculas utilizadas neste trabalho são pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico que possui um cerne diidroxietileno e um eixo de simetria do tipo C_2 , o que proporciona a possibilidade da síntese de inibidores simétricos que podem apresentar uma complementaridade estrutural adequada. Todo o processo da síntese dessas moléculas (sendo a maioria inéditas na literatura) está retratado na dissertação do aluno Ricardo Yaunner, elaborada sob a orientação do professor Joaquim Mendes da Silva (Yaunner, 2010).

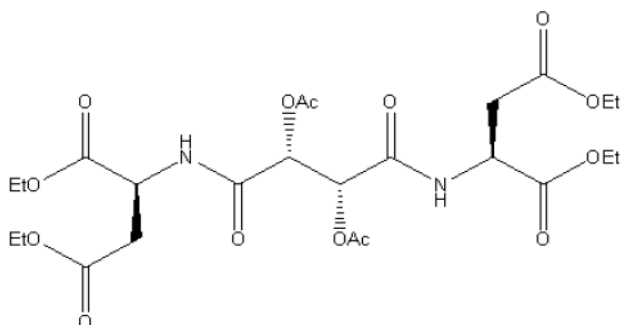
Devido a seu baixo peso molecular, esses compostos conseguem penetrar efetivamente nas membranas biológicas celulares (Barros *et al.*, 2006). Por não serem solúveis em água, as moléculas foram diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido), um solvente orgânico cuja toxicidade foi previamente avaliada sobre células RD e L20B. As diluições ocorreram em DMSO 1% (diluído em meio sem soro) e foram baseadas no peso molecular e no peso em grama de cada substância, fornecidos juntos com as moléculas. Os nomes, estruturas e fórmulas moleculares (FM) das moléculas utilizadas no presente trabalho encontram-se nas próximas páginas.

Devido à complexa nomenclatura das moléculas, elas são retratadas ao longo do trabalho pelas suas abreviações que são:

- | | |
|-------------|-------------|
| (i) RY152 | (v) P2 |
| (ii) RY136 | (vi) P6 |
| (iii) RY108 | (vii) RY200 |
| (iv) RY218B | |

(i) RY152

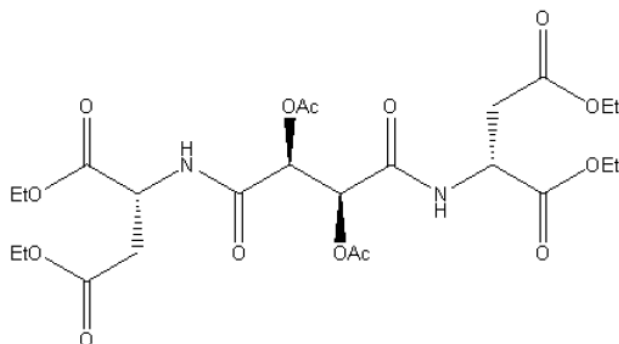
(2*S*)-2-(((2*R*,3*R*)-2,3-bis(acetiloxi)-4-(((1*S*)-3-etoxi-1-(etoxicarbonil)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoil)amino] butanodionato de dietila



F.M: C₂₄H₃₆N₂O₁₄

(ii) RY 136

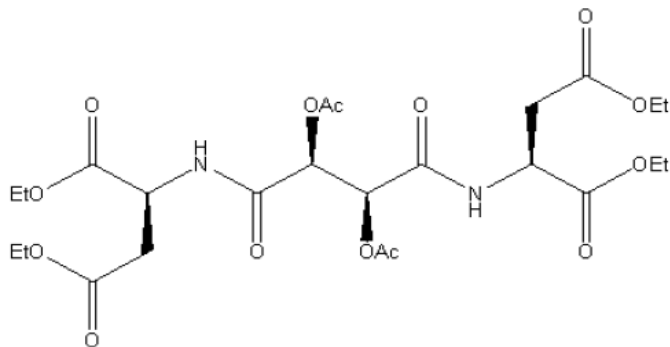
(2*R*)-2-(((2*S*,3*S*)-2,3-bis(acetiloxi)-4-(((1*R*)-3-etoxi-1-(etoxicarbonil)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoil)amino] butanodionato de dietila



F.M: C₂₄H₃₆N₂O₁₄

(iii) RY 108

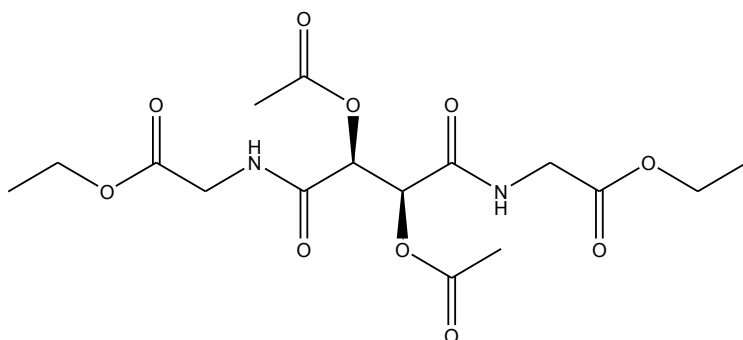
(2*S*)-2-(((2*S*,3*S*)-2,3-bis(acetiloxi)-4-[(1*S*)-3-etoxi-1-(etoxicarbonil)-3-oxopropil]amino)-4-oxobutanoil)amino] butanodionato de dietila



F.M: C₂₄H₃₆N₂O₁₄

(iv) RY 218B

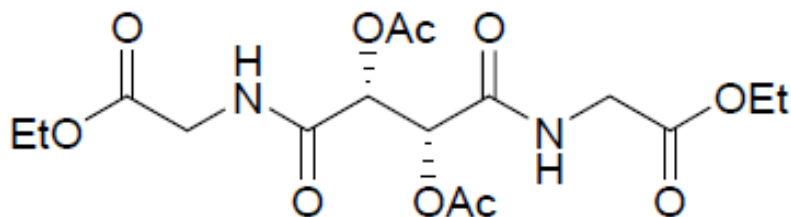
((2*S*,3*S*)-2,3-bis(acetiloxi)-4-[(2-etoxi-2-oxoetil)amino]-4-oxobutanoil) amino)acetato de etila



F.M: C₁₆H₂₄N₂O₁₀

(v) P2

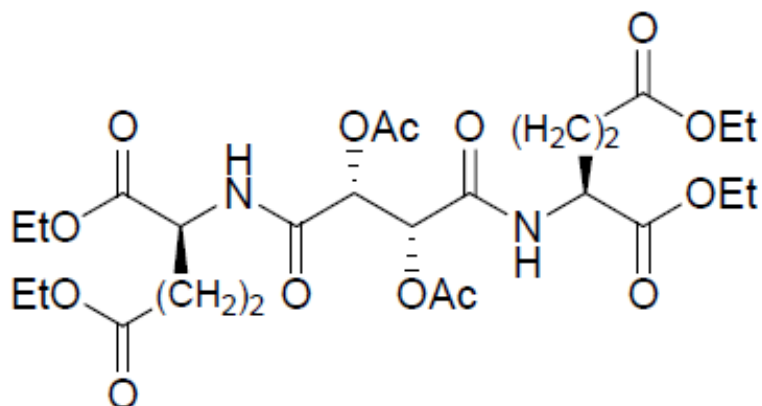
((2*R*,3*R*)-2,3-bis(acetiloxi)-4-[(2-etoxi-2-oxoetil)amino]-4-oxobutanoil) amino)acetato de etila



F.M: C₁₆H₂₄N₂O₁₀

(vi) P6

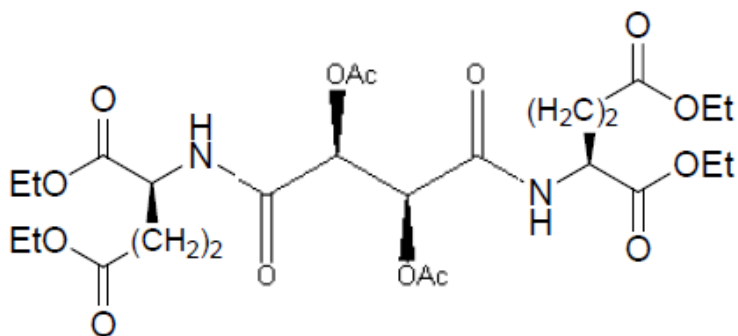
(2S)-2-(((2R,3R)-2,3-bis(acetiloxi)-4-(((1S)-4-etoxi-1-(etoxicarbonil)-4-oxobutil)amino)-4-oxobutanoil)amino]pentanodionato de dietila



F.M: C₂₆H₄₀N₂O₁₄

(vii) RY200

(2S)-2-(((2S,3S)-2,3-bis(acetiloxi)-4-(((1S)-4-etoxi-1-(etoxicarbonil)-4-oxobutil)amino)-4-oxobutanoil)amino]pentanodionato de dietila



F.M: C₂₆H₄₀N₂O₁₄

4. Determinação da viabilidade celular

A citotoxicidade dos compostos foi determinada através da técnica denominada “dye-uptake” (Borenfreund & Puerner, 1985), que consiste na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e sua posterior extração e quantificação por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm. O preparo da microplaca consiste na realização de uma suspensão celular (RD ou L20B) e distribuição de 100µL em cada poço. A placa é incubada em estufa a 37°C por cerca de 24h para atingir a confluência desejada. O ensaio é realizado através do tratamento das células com diluições seriadas em triplicata do composto e mantidas em estufa nas condições adequadas por 24h - foram utilizadas oito diluições: 300µM, 150 µM, 75 µM, 38 µM, 19 µM, 10 µM, 5 µM e 2,5 µM. Após esse período, 100 µL da solução de vermelho neutro a 50 µg/L são adicionados às células. As placas ficam incubadas por 3 horas em estufa para a incorporação do corante. Em seguida, as placas são lavadas duas vezes com PBS (tampão salina fosfato) e as células fixadas por 5 minutos com 100 µL de formaldeído 20%. A solução fixadora é, então, retirada e o corante extraído por 20 minutos, com 100 µL de uma solução metanol 50% e ácido acético 1%. Por fim, as placas são lidas em espectrofotômetro. As leituras foram transformadas em porcentagem de células viáveis, tratadas com cada composto em cada concentração, em relação a células controle (não-tratadas).

5. Infecção das células

Para os experimentos, a infecção é feita em monocamadas de células RD e L20B confluentes cultivadas em placas de 96 furos. O meio de cultura é retirado e a monocamada é lavada com PBS. Em seguida, adiciona-se a suspensão viral cujo período de adsorção é de 1 hora nas condições adequadas. A suspensão viral foi previamente titulada para garantir que a diluição do vírus utilizada gere efeito citopático nas culturas celulares. Após este tempo de 1 hora, descarta-se o meio de cultura e lava-se a monocamada com PBS para retirar o vírus não adsorvido. A seguir, adiciona-se 100µl de meio de cultura completo com ou sem as moléculas em estudo nas concentrações indicadas em cada experimento, e as culturas são mantidas nas condições adequadas.

Também foram feitos experimentos semelhantes em que primeiro ocorre a incubação das células com diferentes concentrações não tóxicas das drogas por 48 horas, e em seguida ocorre a infecção como descrito acima, sendo que, no final, adiciona-se 100µl de meio de cultura somente, sem as moléculas.

O efeito antiviral foi avaliado através da observação dessas células no microscópio invertido em diversos momentos após a infecção (de hora em hora), sempre comparando as células infectadas por poliovírus e incubadas com as diferentes concentrações de cada composto com o controle viral (células com vírus) e o controle celular (células só com meio). Essa observação se baseia no aparecimento do efeito citopático que é muito característico em poliovírus e facilmente identificável.

RESULTADOS

1. Efeito das moléculas sobre a viabilidade celular

O primeiro experimento a ser realizado é a determinação da viabilidade celular; este é de suma importância para poder conduzir qualquer outro experimento com substâncias de potencial antiviral, para que se possa testar concentrações das moléculas onde o efeito antiviral não seja confundido com a toxicidade da molécula, pois se a célula está sofrendo com o efeito tóxico, isto vai levar à uma baixa da produção viral. Para a avaliação da citotoxicidade foram realizados experimentos determinando a viabilidade celular na presença de diversas concentrações das sete moléculas. Células RD e L20B confluentes foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de cada molécula, em diluições seriadas. Cada concentração foi testada em triplicata. As células foram incubadas com corante vermelho neutro e, em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro determinando assim a viabilidade celular, como descrito em Material e Métodos.

Os resultados apresentados pelas leituras demonstram que todas as moléculas apresentam faixas de concentração nas quais se observa baixa toxicidade em células RD e L20B. Nenhuma das moléculas se mostrou tóxica para as células, todas elas apresentaram mais de 70% de viabilidade na concentração de 300 μ M, algumas delas chegando a mais de 90% de viabilidade nesta mesma concentração.

Esses resultados estão representados nos gráficos a seguir, os gráficos de 1 à 7 se referem à viabilidade em células RD e os gráficos de 8 à 14 são relativos aos experimentos conduzidos com células L20B. Os valores indicam o percentual de células viáveis (% viabilidade) em diferentes concentrações (de 2,5 μ M à 300 μ M) em relação à células controle (não-tratadas), e correspondem à média de três experimentos.

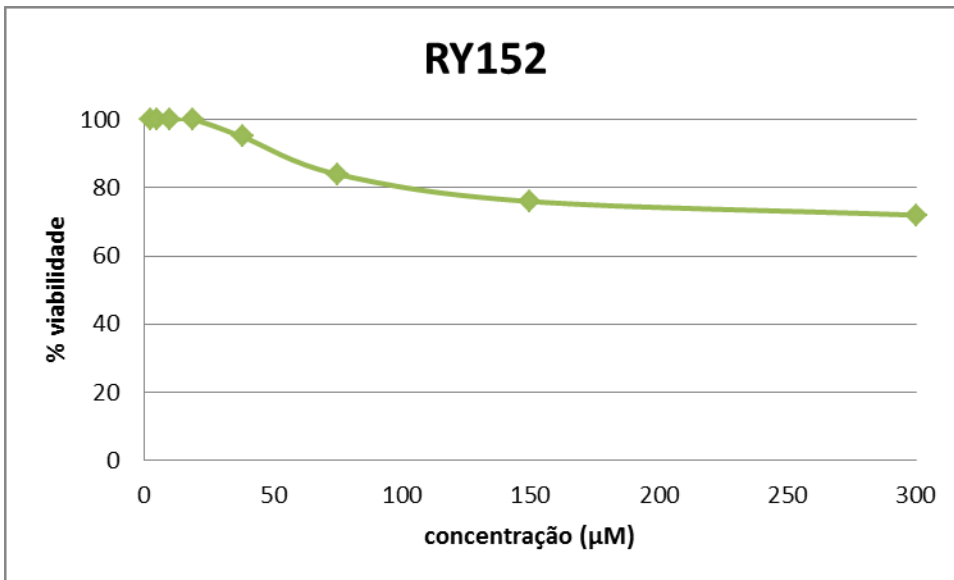


Gráfico 1. Viabilidade de células RD com RY152. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY152 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 72%.

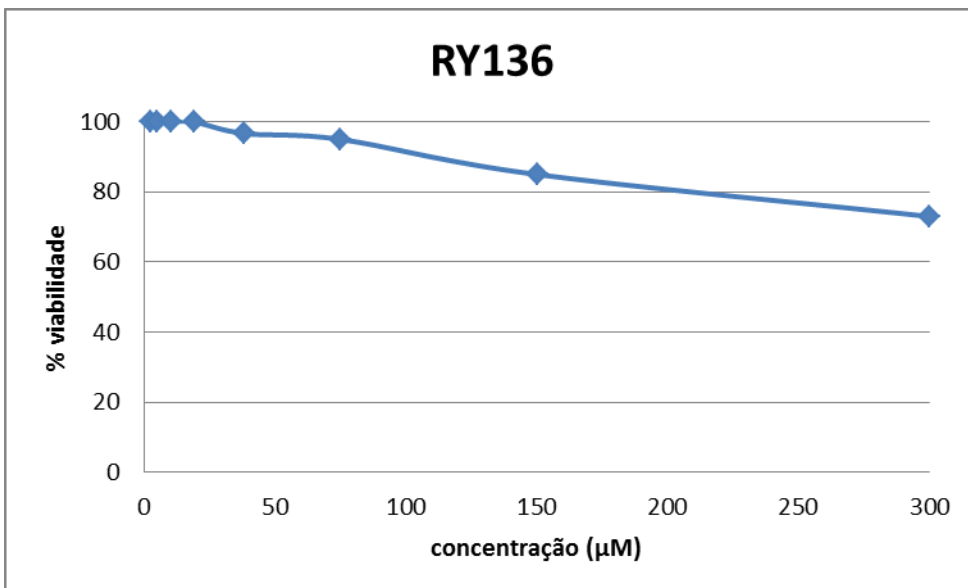


Gráfico 2. Viabilidade de células RD com RY136. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY136 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 73%.

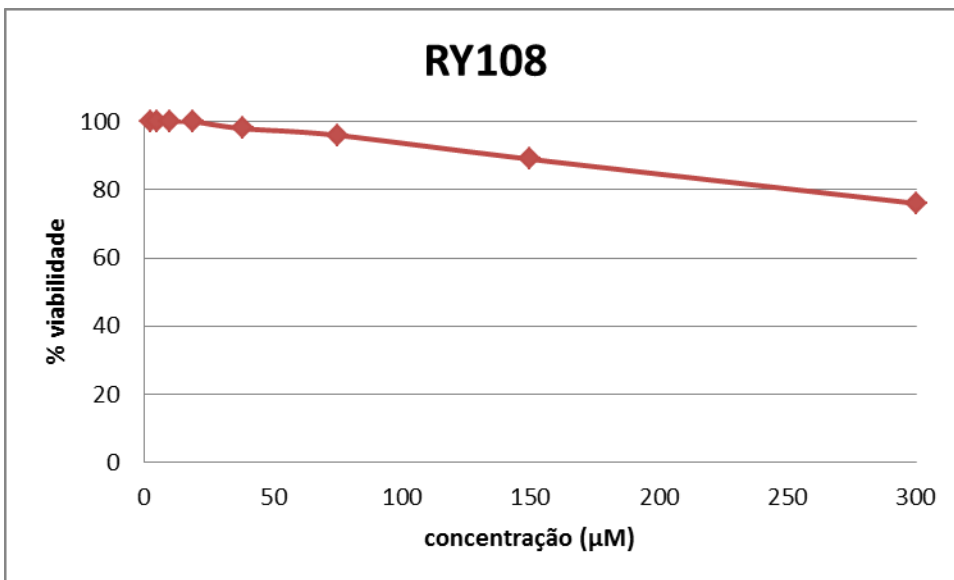


Gráfico 3. Viabilidade de células RD com RY108. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY108 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 76%.

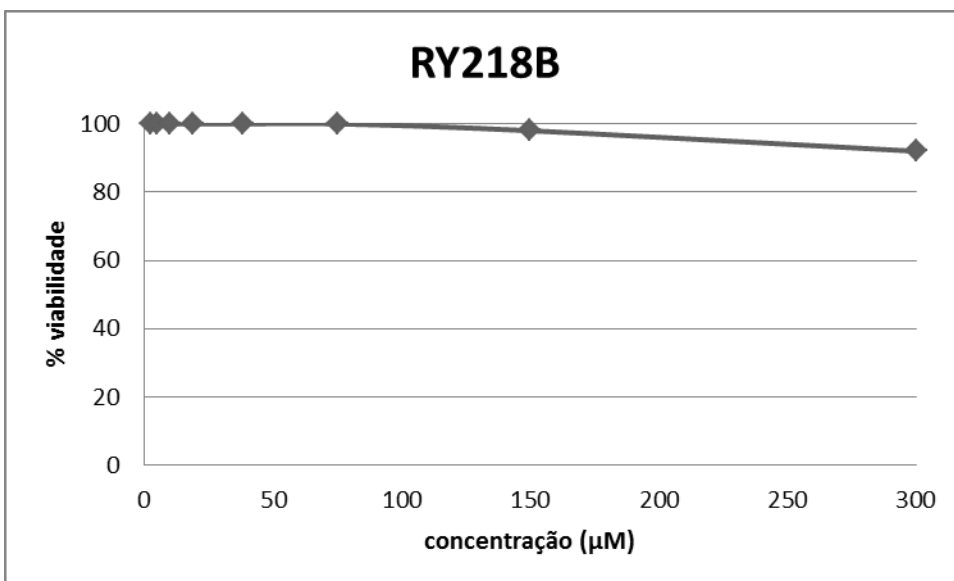


Gráfico 4. Viabilidade de células RD com RY218B. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY218B e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi muito boa, 92%.

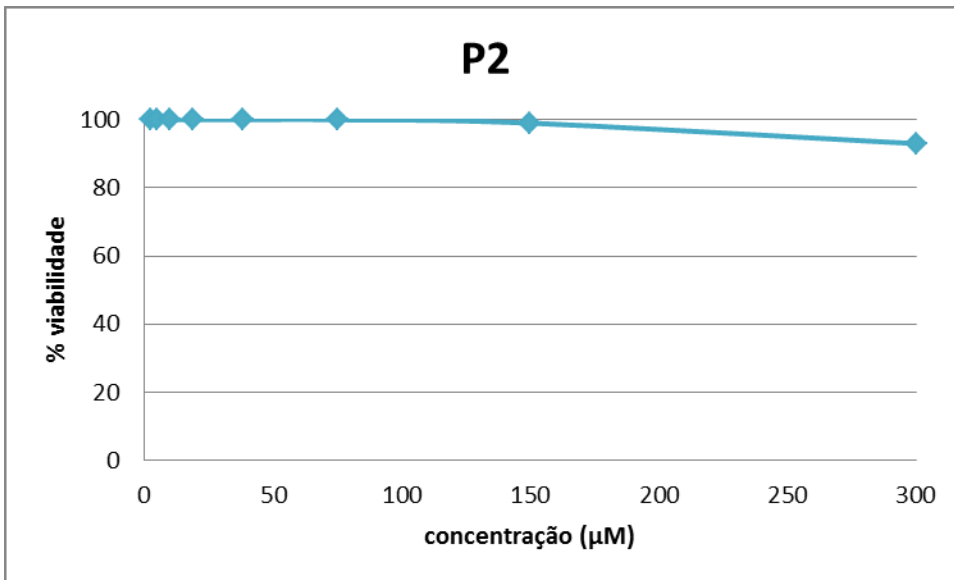


Gráfico 5. Viabilidade de células RD com P2. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula P2 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi bem alta, 93%.

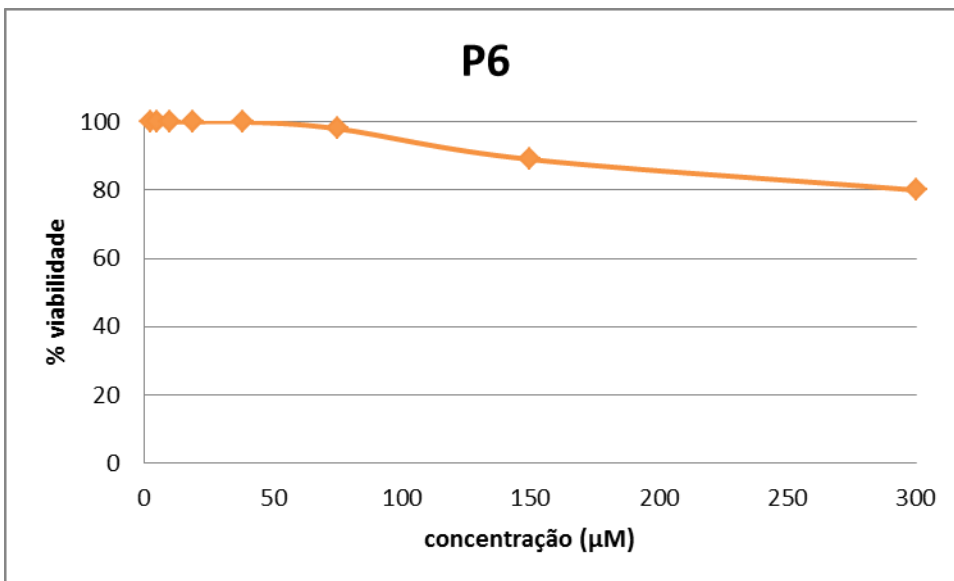


Gráfico 6. Viabilidade de células RD com P6. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula P6 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 80%.

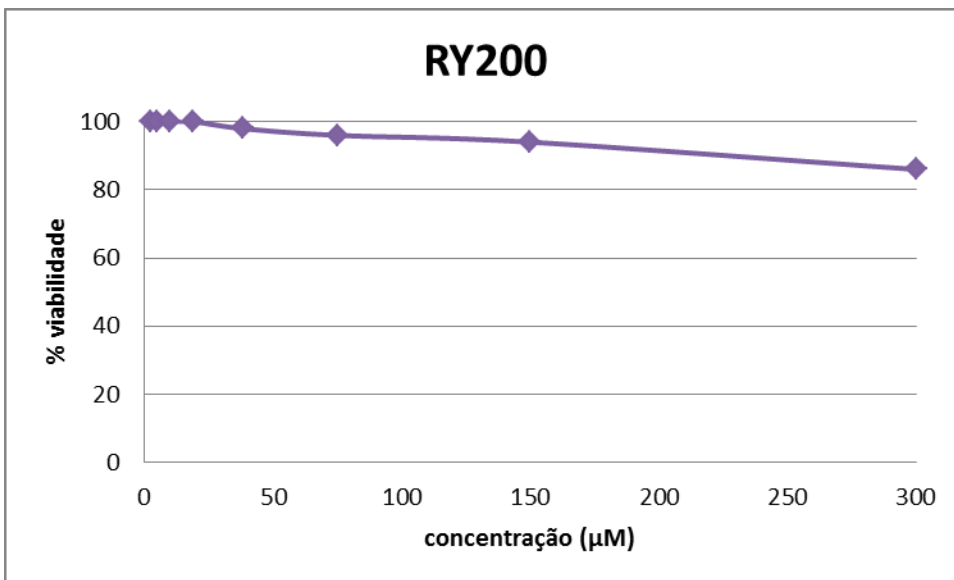


Gráfico 7. Viabilidade de células RD com RY200. Células RD confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY200 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 86%.

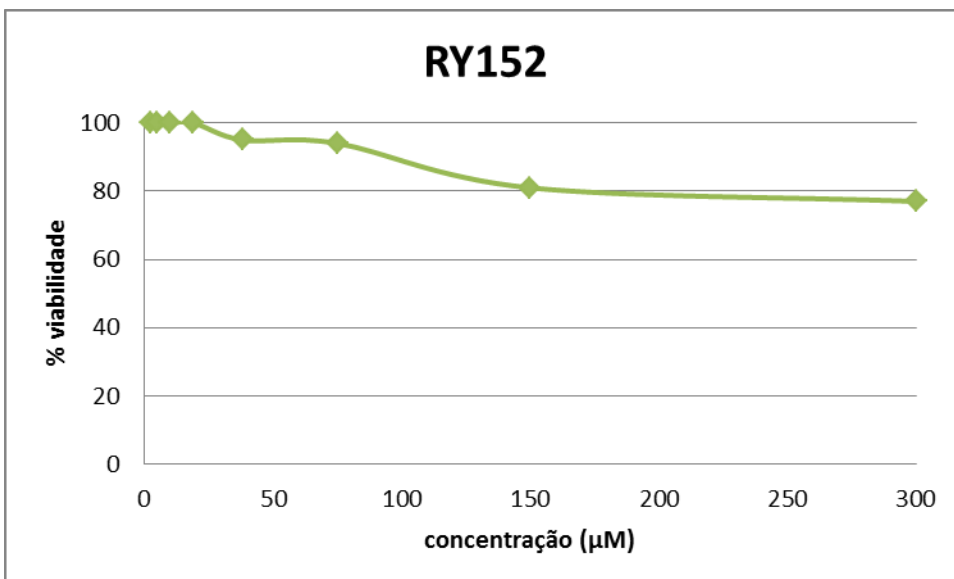


Gráfico 8. Viabilidade de células L20B com RY152. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY152 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 77%.

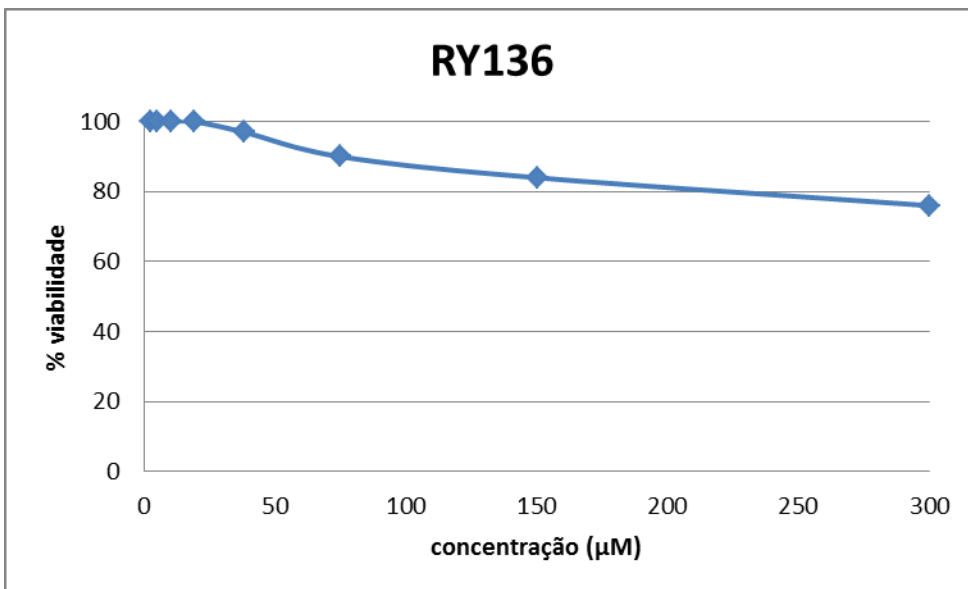


Gráfico 9. Viabilidade de células L20B com RY136. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY136 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 76%.

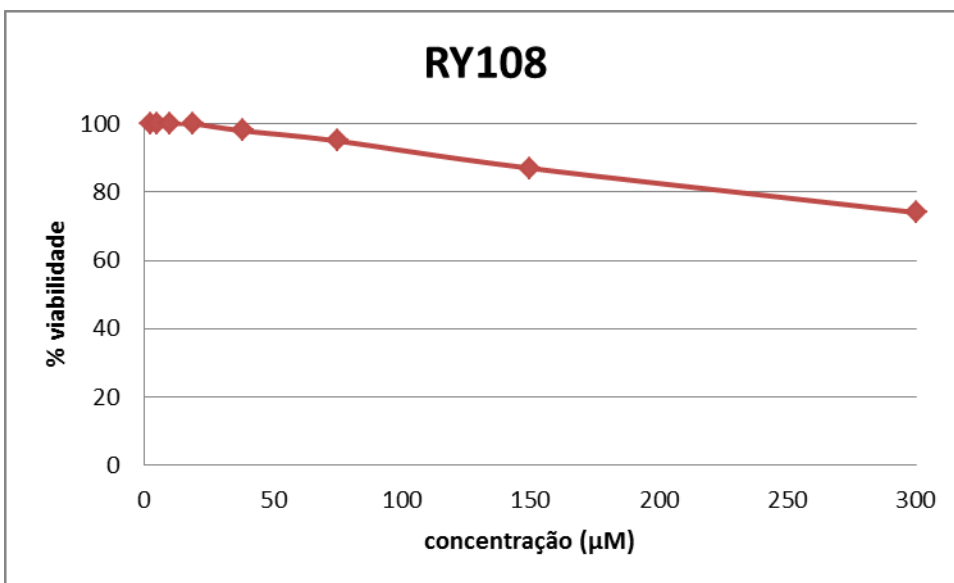


Gráfico 10. Viabilidade de células L20B com RY108. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY108 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 74%.

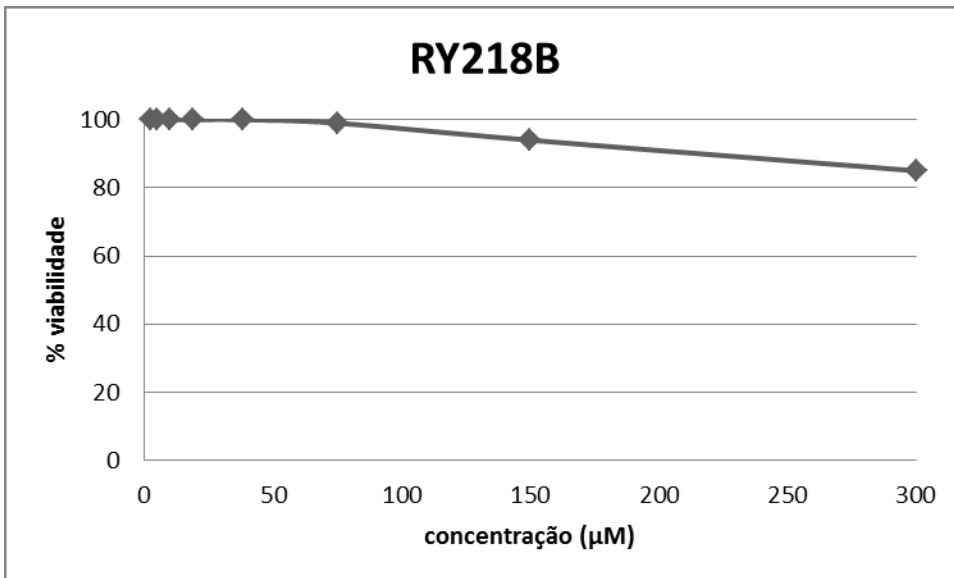


Gráfico 11. Viabilidade de células L20B com RY218B. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY218B e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 85%.

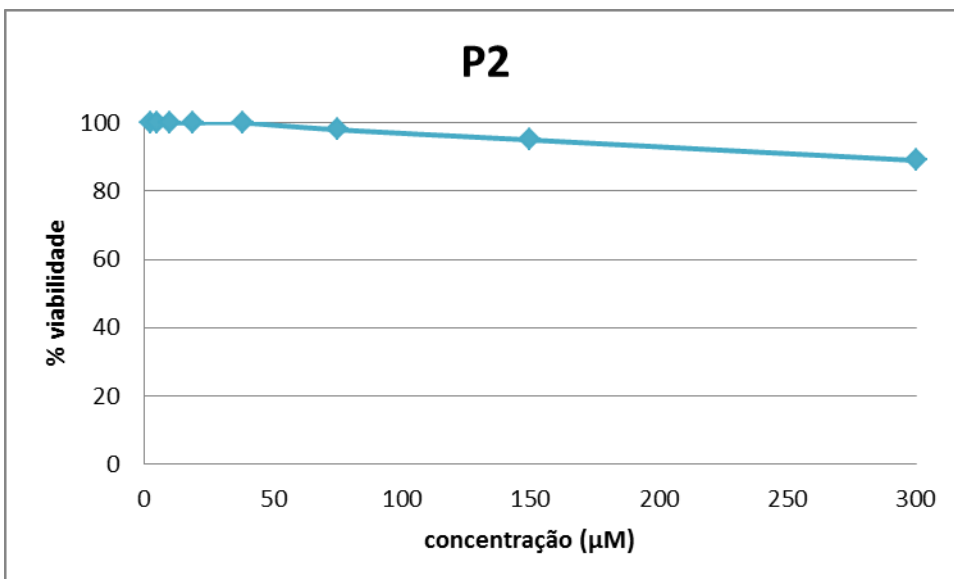


Gráfico 12. Viabilidade de células L20B com P2. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula P2 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 89%.

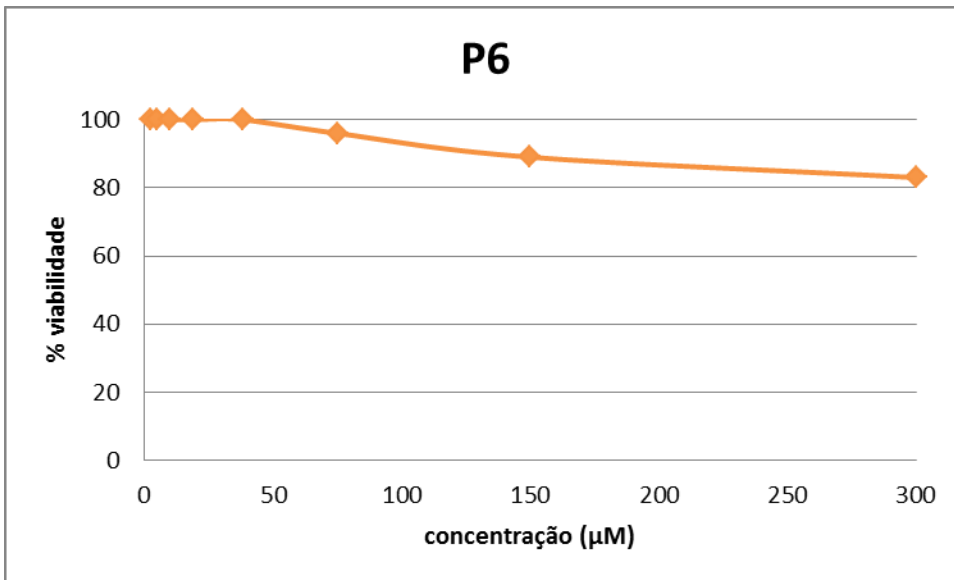


Gráfico 13. Viabilidade de células L20B com P6. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula P6 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 83%.

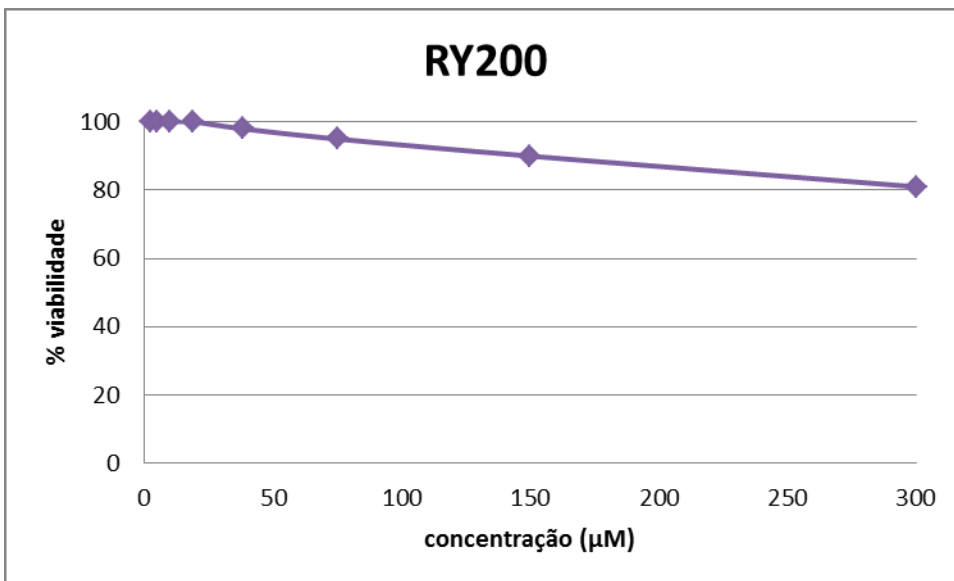


Gráfico 14. Viabilidade de células L20B com RY200. Células L20B confluentes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da molécula RY200 e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. Em 300µM, a viabilidade foi de 81%.

2. CC₉₀

Com os dados da citotoxicidade em mãos, foi possível elaborar uma tabela indicando a concentração das diferentes moléculas que permite 90% de viabilidade celular (CC₉₀), ou seja, a concentração dos compostos que reduz em 10% a viabilidade das células RD e L20B. Os dados obtidos foram estimados a partir dos valores médios de três experimentos

Molécula	CC ₉₀ (μM) em RD	CC ₉₀ (μM) em L20B
RY152	55±3,37	97±1,57
RY136	105±5,12	94±2,06
RY108	132±2,46	118±3,42
RY218B	302±2,04	225±1,94
P2	310±4,23	254±2,18
P6	134±3,77	133±2,35
RY200	212±2,76	152±2,11

Tabela 3. CC₉₀. A concentração das moléculas em que a viabilidade das células RD e L20B está em 90%.

3. Efeito antiviral das moléculas sobre o poliovírus

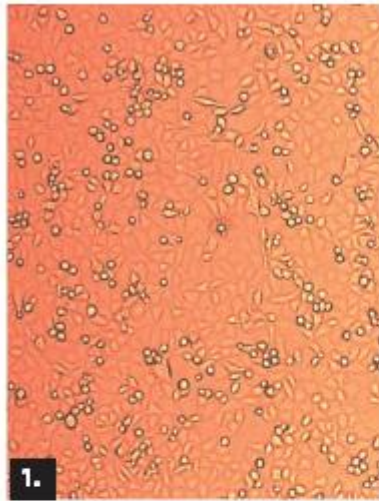
Após avaliar as faixas de concentração com baixa toxicidade em células RD e L20B, a atividade antiviral das moléculas em cultura de células foi testada. Para tal fim, as células foram infectadas com poliovírus e, posteriormente tratadas com concentrações crescentes das moléculas, sempre em concentrações não tóxicas para as células, ou seja, que apresentaram uma viabilidade acima de 80%. Cada concentração foi testada em triplicata e o experimento foi repetido 3 vezes para cada linhagem celular.

Nenhuma das sete moléculas demonstrou atividade antiviral sobre o poliovírus, nem protegendo as células quando adicionadas antes da infecção, nem evitando a infecção quando acrescentadas depois. Essas conclusões foram tiradas pela observação do efeito citopático (EC) nos experimentos comparando sempre com o controle viral em diferentes momentos após a infecção. A presença das moléculas, sejam elas adicionadas antes ou depois do poliovírus, não mostrou nenhuma diferença em relação ao EC quando comparado com o controle viral.

O EC do poliovírus em monocamadas de células é bem característico e facilmente identificável pois as células infectadas apresentam mudanças morfológicas específicas como arredondamento, enrugamento e acentuada picnose nuclear (condensação da cromatina), provocando o descolamento da superfície do suporte. Além disso, também há a proliferação das vesículas membranosas e mudanças na permeabilidade da membrana nas células infectadas com poliovírus.

O EC causado por poliovírus em células L20B e em células RD encontra-se exemplificado nas **figuras 10 e 11**. Não se trata de um resultado deste trabalho mas de um exemplo para mostrar o quão distinto e facilmente detectado é o EC do poliovírus. Com isso, demonstra-se que os resultados obtidos baseados na observação são confiáveis.

Em ambas as figuras encontram-se, no topo a direita, as células não infectadas formando uma monocamada confluyente indicando a aparência característica de células não inoculadas. Os outros quadros mostram as células em momentos após a infecção com o poliovírus. É possível perceber que as células infectadas apresentam modificações morfológicas nítidas, como o arredondamento, caracterizando o efeito citopático dos poliovírus.



L20B: não inoculada

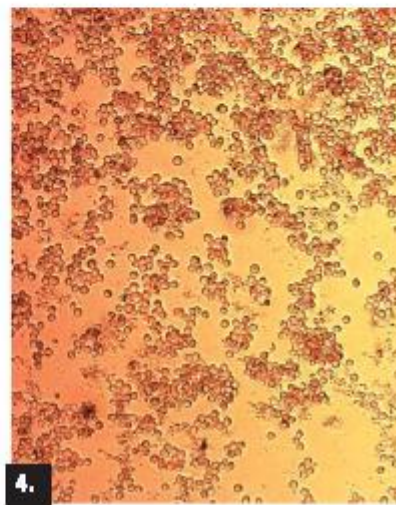
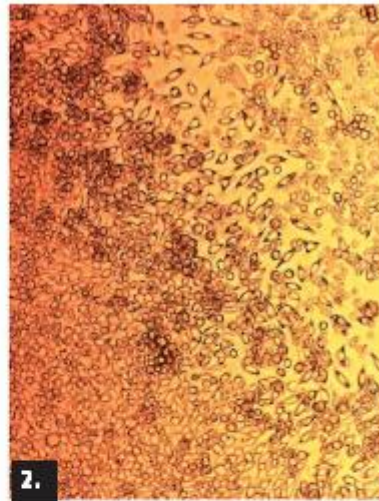
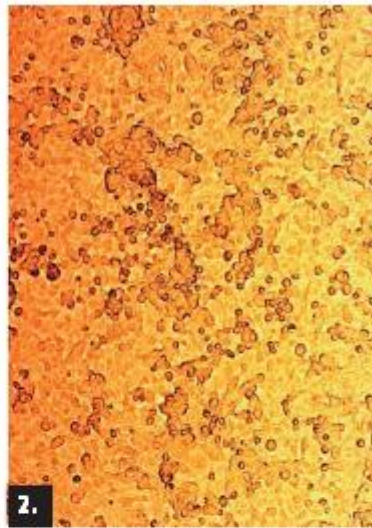
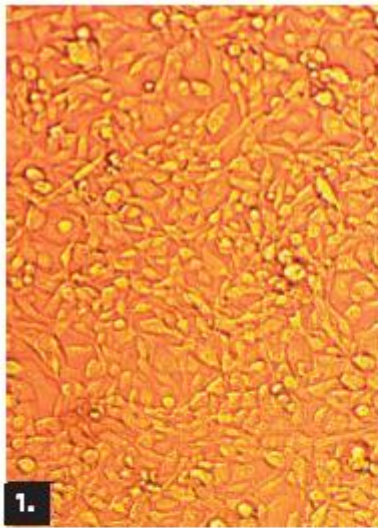


Figura 10. Efeito citopático do poliovírus em células L20B.

No topo a direita encontram-se células L20B não inoculadas, sem vírus, apenas com meio de cultura (controle celular). Nos demais quadros estão retratadas as células L20B inoculadas com poliovírus em diferentes momentos após a infecção. Com isso é possível perceber facilmente a diferença da aparência característica de células L20B não-infectadas para as infectadas.



RD: não inoculada



Figura 11. Efeito citopático do poliovírus em células RD.

No topo a direita encontram-se células RD não inoculadas, apenas com meio de cultura (controle celular). Nos demais quadros estão retratadas as células RD inoculadas com poliovírus em diferentes momentos após a infecção. Com isso é possível perceber facilmente a diferença da aparência característica de células RD não-infectadas para as infectadas.

DISCUSSÃO

Os vírus são agentes patogênicos capazes de provocar doenças graves em seres humanos, animais e plantas. Devido à sua importância clínica e científica, os vírus foram e continuam sendo muito estudados. Os estudos sobre vírus, seus ciclos replicativos e suas interações com a célula hospedeira estabeleceram várias áreas de pesquisa ao longo do tempo. A descoberta e desenvolvimento de novos agentes antivirais é um importante componente da pesquisa em virologia e já resultou no uso clínico de diversos compostos eficazes direcionados contra elementos virais.

As proteases virais são enzimas cujas funções são essenciais durante o ciclo biológico do vírus, elas representam um ótimo alvo na pesquisa de antivirais e têm sido intensamente estudadas nos últimos 30 anos. As análises estruturais e sequenciais das proteases virais demonstraram o quão compactas são essas enzimas, elas são geralmente bem menores que as proteases celulares já estudadas. Além da diferença de tamanho, a maioria das proteases virais possuem pontes dissulfeto que não se encontram em proteases celulares. As proteases virais têm pouca homologia de sequência com as proteínas celulares, mesmo quando compartilham a mesma estrutura tridimensional. Devido às suas seqüências únicas e tamanhos compactos, as proteases virais geralmente têm especificidade de substrato bem distinta e muito significativa para o desenvolvimento de seus inibidores. Todas essas características tornam as proteases virais excelentes alvos na pesquisa de antivirais; os compostos específicos para inibir essas enzimas virais têm pouca probabilidade de provocar uma reação cruzada indesejável com proteínas celulares já que não há homologia nas seqüências delas, ou seja, os inibidores de proteases virais costumam ser pouco citotóxicos (Tong, 2002).

Os compostos testados neste trabalho foram sintetizados visando inibir um alvo bem específico, a serino protease do HCV. A estrutura geral dos protótipos a inibidores de protease (**Figura 12**) visa a inativação da tríade catalítica desta enzima e se baseia em modelos presentes na literatura (Hedstrom, 2002).

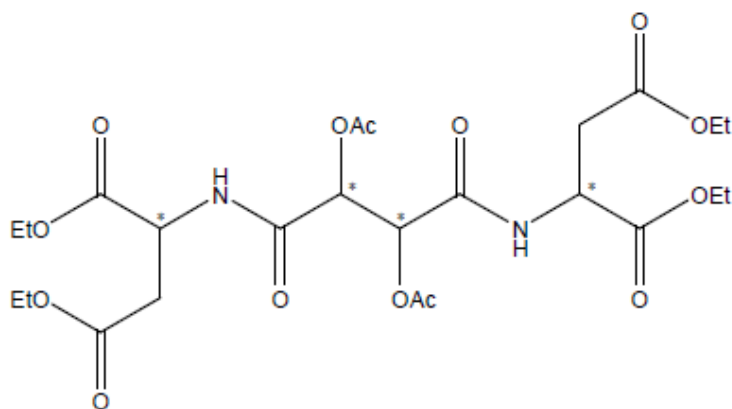


Figura 12. Estrutura geral do composto protótipo. Estrutura que originou os pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico visando o desenvolvimento de inibidores de proteases (Yaunner, 2010).

No presente trabalho, os pseudopeptídeos citados acima foram testados na replicação dos poliovírus visando a inibição das proteases 2A e 3C. Essas duas enzimas virais são classificadas como cisteíno proteases devido ao resíduo de cisteína presente em seu sítio ativo. Comparações feitas entre sequências de proteases celulares levaram à dedução de que, apesar de serem cisteíno proteases, 2A e 3C possuem a estrutura conformacional das quimotripsinas que ficam na família das serino proteases (Allaire *et al.*, 1994; Matthews *et al.*, 1994; Bergmann *et al.*, 1997; Mosimann *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 1999; Seipelt *et al.*, 1999), grupo ao qual pertence a NS3 protease do HCV (Tong, 2002). As serino proteases utilizam serina no seu sítio catalítico enquanto as cisteíno proteases usam cisteína. Apesar desta diferença molecular, as proteases 2A e 3C dos poliovírus e a NS3 do HCV têm, todas três, conformação tridimensional de quimotripsina o que torna seus mecanismos de ação muito semelhantes já que a atividade das enzimas é intimamente ligada à estrutura delas (Rawlings & Barrett, 1993; 1994). Além disso, a protease 2A dos poliovírus possui um íon de zinco (Zn^{2+}), essencial para sua estabilidade e atividade, ligado covalentemente à sua extremidade C-terminal (Racaniello, 2001). A NS3 serino-protease do HCV também possui um íon de Zn^{2+} ligado à sua estrutura que é essencial para o seu funcionamento; esta ligação é equivalente à esta da 2A (Tong, 2002), o que demonstra mais uma semelhança entre essas enzimas.

Após terem sido sintetizados e caracterizados, os compostos foram avaliados quanto à sua atividade inibitória frente às proteases do HIV, do HCV e do DENV-2 no Laboratório de Genômica Estrutural do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e Laboratório de Virologia Molecular Animal, ambos localizados na UFRJ. Os resultados de inibição da protease do HCV mostram que apenas um dos compostos (o RY136) provocou a diminuição da atividade relativa desta enzima. Já para as proteases do HIV e do DENV-2, os compostos testados não foram capazes de modificar a atividade enzimática significativamente (Yaunner *et al.*, 2011).

A protease do HIV é uma protease aspártica cujo sítio catalítico é diferente das serino proteases. Essa foi possivelmente a razão pela qual os compostos utilizados não foram capazes de inibi-la já que foram desenvolvidos para inativar a tríade catalítica de serino-proteases. A protease do DENV-2, por sua vez, é uma serino-protease mas difere da HCV protease por não possui um átomo de metal em sua estrutura (Luo *et al.*, 2008). Uma possível explicação para a falta de atividade inibitória é a relação de especificidade de substrato para esta enzima que utiliza um aminoácido com um resíduo ácido que não interagiu com os sítios próximos ao sítio catalítico. Estudos sobre a protease da Dengue mostram que estes reconhecem preferencialmente pares de resíduos de aminoácidos básicos (Chanprapaph *et al.*, 2005; Melino & Paci, 2007; Yaunner, 2010). Em relação aos resultados de inibição da protease do HCV obtidos, apenas um composto foi capaz de diminuir a atividade desta enzima. As moléculas testadas apresentavam centros quirais diferentes e apenas um foi reconhecido por esta enzima sugerindo uma alta especificidade na interação entre o pseudopeptídeo e a protease (Yaunner *et al.*, 2011).

Os pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico não demonstraram nenhuma atividade antiviral contra os poliovírus como demonstrado nos resultados deste trabalho. Esta falta de atividade é provavelmente devido ao fato das proteases dos poliovírus serem cisteíno-proteases cuja tríade catalítica difere dessa das serino-protease pois cada família de proteases possui um grupo específico de resíduos de aminoácidos agrupados em uma configuração particular para formar o sítio ativo (Neurath, 1986). Isto também se aplica à protease do HIV que se encontra em uma terceira família, as aspártico-proteases.

Os resultados encontrados neste trabalho e em todos os citados acima sugerem que os pseudopeptídeos testados são compostos muito específicos e não representam bons candidatos a inibidores de proteases. Apesar disto, o único resultado positivo encontrado, a inibição da HCV protease pelo composto RY136, motiva a continuação dos estudos relacionados a este grupo de moléculas com este padrão de centro quiral. Este resultado também reforça a alta especificidade na interação entre o composto e a enzima, necessária para uma atividade inibitória significativa (Yaunner, 2010).

Em relação aos poliovírus especificamente, e aos picornavírus de forma geral, existem muitas linhas de pesquisas sobre o desenvolvimento de inibidores de proteases virais. Os principais trabalhos nesta área são sobre inibidores da protease 3C, principalmente dos rinovírus (HRV), responsáveis pelo resfriado comum. Até hoje, os principais compostos desenvolvidos nesta linha foram o rupintrivir (ou AG7088) e seu análogo chamado de “Composto 1” (ou AG7404). Nos estudos sobre HRV, o rupintrivir se mostrou um inibidor irreversível da função da protease 3C do HRV apresentando uma forte atividade anti-HRV de amplo espectro (Patick *et al.*, 1999; Binford *et al.*, 2005), apesar disto, seu desenvolvimento foi finalizado na fase clínica por apresentar atividade insatisfatória em estudos de infecção natural de rinovírus, além de não ter uma boa biodisponibilidade oral (Patick, 2006; Sênior, 2002). O Composto 1 foi definido como um análogo do rupintrivir que possui o mesmo mecanismo de ação mas com uma melhor biodisponibilidade oral, ele se mostrou seguro e bem tolerado em humanos. Contudo, não há previsão para o avanço do desenvolvimento deste composto que também não passou da fase clínica (Patick, 2006; De Palma *et al.*, 2008; Collett *et al.*, 2008).

Devido à natureza conservada da protease 3C nos picornavírus, os dois compostos também foram testados em poliovírus; ambos mostraram uma forte atividade antiviral frente aos três sorotipos vacinais do poliovírus sem apresentar nenhum sinal de citotoxicidade nas maiores concentrações testadas. A atividade *in vitro* desses inibidores de proteases foi semelhante para os poliovírus e rinovírus (sendo estes últimos os vírus contra os quais os compostos foram originalmente desenvolvidos) (Patick *et al.*, 1999; Patick *et al.*, 2005). Esses resultados apontam esses inibidores como fortes candidatos para estudos mais aprofundados em relação ao tratamento e à profilaxia da infecção por poliovírus, principalmente o

Composto 1 pela sua excelente biodisponibilidade oral e seu perfil farmacocinético mais favorável e seguro (De Palma *et al.*, 2008). Atualmente nenhum antiviral está aprovado contra os poliovírus e ainda não existe nenhum medicamento em uso clínico contra qualquer picornavírus (Merilahti *et al.*, 2012).

CONCLUSÃO

- (i) Os compostos avaliados não se mostraram tóxicos às células; em ambas as linhagens celulares testadas, as moléculas apresentaram ótimas faixas de concentração não-tóxicas às células.

- (ii) Os compostos não foram capazes de inibir a replicação dos poliovírus quando adicionados em células previamente infectadas com poliovírus.

- (iii) Não foi detectado nenhum efeito antiviral dos compostos quando estes foram adicionados na cultura de células antes da infecção com poliovírus.

BIBLIOGRAFIA

Abe T, Kaname Y, Hamamoto I. Hepatitis C virus nonstructural protein 5a modulates the toll like receptor-myd88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J. Virol.* 2007; 81: 8953-8966.

Agirre A, Barco A, Carrasco L, Nieva JL. Viroporin mediated membrane permeabilization: pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J Bio Chem.* 2002; 277, 43: 40434–40441.

Agol VA. Picornavirus genome: an overview. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, Semler BL, Wimmer E, Eds., ASM Press, Washington, DC, USA. 2002; 127–148

Agol VI, Belov GA, Bienz K. Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology.* 1998. 252, 2: 343–353.

Agol VI, Gmyl AP. Viral security proteins: counteracting host defenses. *Rev Microbiol.* 2010 Dec; 8 (12): 867-78. doi: 10.1038/nrmicro2452.

Allaire M, Chernaia MM, Malcolm BA, James MN. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature.* 1994; 369 (6475): 72-6.

Amineva SP, Aminev AG, Palmenberg AC, Gern JE. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J Gen Virol.* 2004; 85: 2969 - 2979.

Aylward B, Tangermann R. The global polio eradication initiative: Lessons learned and prospects for success. *Vaccine* 29S. 2011; D80 – D85.

Barrett AJ. Bioinformatics of proteases in the MEROPS database. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2004; 7(3):334-341.

Barros JC, Silva JFM, Calazan AR, Tanuri A, Brindeiro RM, Williamson JS, Antunes OAC. Synthesis of Pseudopeptides Derived from (R,R)-Tartaric Acid as Potential Inhibitors of HIV-Protease. *Lett Org Chem.* 2006; 3, 12: 882-886.

Baxter A, Chambers M, Edfeldt F, Edman K, Freeman A, Johansson C, King S, Morley A, Petersen J, Rawlins P, Spadola L, Thong B, Van de Poel H, Williams N. Non-covalent inhibitors of rhinovirus 3C protease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 21(2), 777-780.

Bedard KM, Semler BL. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* 2004; 6: 702–713.

Bergmann EM, Mosimann SC, Chernaia MM, Malcolm BA, James MN. The refined crystal structure of the 3C gene product from hepatitis A virus: specific proteinase activity and RNA recognition. *J. Virol.* 1997; 71, 3: 2436-2448.

Bienz K, Egger D, Troxler M, Pasamontes L. Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol.* 1990; 64: 1156-1163.

Binford SL, Maldonado F, Brothers MA, Weady PT, Zalman LS, Meador 3rd JW, Matthews DA, Patick AK. Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49, 619–626.

Blondel B, Colbère-Garapin F, Couderc T, Wirotius A, Guivel-Benhassine F. Poliovirus, pathogenesis of poliomyelitis, and apoptosis. *Current Topics in Microb and Immunol.* 2005; 289: 25–56.

Bodian D, Morgan IM, Howe HA. Differentiation of types of poliomyelitis viruses. iii. The grouping of fourteen strains into three basic immunologic types. *Am J Hyg.* 1949; 49: 234–45.

Bodian D, Horstmann DH. Polioviruses. In *Viral and Rickettsial Infections of Man*, Horsfall FL, Tamm I, Eds., Lippincott, Philadelphia, USA. 1965: 430– 473.

Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985; 24 (2-3): 119 - 124.

Buenz EJ, Howe CL. Picornaviruses and cell death. *Trends in Microbiol.* 2006; 14, 1: 28-37.

Calandria C, Irurzun A, Barco A, Carrasco L. Individual expression of poliovirus 2A and 3C induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Res.* 2004; 104, 1: 39–49.

Cameron CE, Oh HS, Moustafa IM. Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiol.* 2010; 5 (6): 867–881.

Carrasco L, Guinea R, Irurzun A, Barco A. Effects of viral replication on cellular membrane metabolism and function. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, Semler BL, Wimmer E, Eds., ASM Press, Washington, DC, USA. 2002; 337–356.

Castelló A, Álvarez E, Carrasco L. The Multifaceted Poliovirus 2A Protease: Regulation of Gene Expression by Picornavirus Proteases. *J Biomed Biotec.* 2011; 1-23.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* 9th edition. Edited by: Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S. Washington, D.C. Public Health Foundation. 2006.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Updated recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) regarding routine poliovirus vaccination. 2009.

CDC. Status of global Laboratory Network for Poliomyelitis Eradication, 1994-1996. MMWR 1997b. Morb Mortal Wkly Rep. 1997; (46): 692-694.

CDC. Progress toward global eradication of poliomyelitis, January 2003-April 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004; 53 (24): 532-535.

CDC. Progress Toward Poliomyelitis Eradication - Afghanistan and Pakistan, January 2010–September 2011. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011; 60 (44): 1523-1527.

CDC. Progress Toward Poliomyelitis Eradication - Afghanistan and Pakistan: January 2011–August 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012; 61(39): 790-795.

Chase AJ, Semler BL. Viral subversion of host functions for picornavirus translation and RNA replication. *Futur Virol.* 2012; 7(2): 179-191.

Chanprapaph S, Saparpakorn P, Sangma C. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serino protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 330: 1237-1246.

Chen TC, Weng KF, Chang SC, Lin JY, Huang PN, Shih SR. Development of antiviral agents for enteroviruses. *J Antimicrob Chem.* 2008; 62: 1169-1173.

Cho MW, Teterina N, Egger D, Bienz K, Ehrenfeld E. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology*. 1994; 202: 129-145.

Collett MS, Neyts J, Modlin JF. A case for developing antiviral drugs against polio. *Antiviral Res.* 2008; 79: 179–187.

Couzin J. Report concludes polio drugs are needed - after disease is eradicated. *Science*. 2006; 311: 1539.

Da Silva EE, de Azevedo JPR, Costa EV. Enteroviroses de importância médica. In Coura JR do livro *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2005; vol II: 1681 – 1695.

De Clercq E. Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev Med Chem*. 2002; 2 (2): 163-75.

De Clercq E. Antivirals: Past, present and future. *Biochem Pharmacol*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.011>

De Francesco R, Carfi A. Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3-4A serino protease or the NS5B RNA dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; 59: 1242-1262.

De Jesus NH. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology*. 2007; 4:70. doi:10.1186/1743-422X-4-70.

De la Torre JC, Giachetti C, Semler BL, Holland JJ. High frequency of single-base transitions and extreme frequency of precise multiple-base reversion mutations in poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1992; 89: 2531–2535.

De Palma AM, Puerstinger G, Wimmer E, Patick AK, Andries K, Rombaut B, De Clercq E, Neyts J. Potential use of antiviral agents in polio eradication. *Emerg.Infect.Dis*. 2008; 14, 4: 545–551.

De Palma AM, Heggermont W, Lanke K, Coutard B, Bergmann M, Monforte AM, Canard B, De Clercq E, Chimirri A, Puerstinger G, Rohayem J, Van Kuppeveld F, Neyts J. The thiazolobenzimidazole TBZE-029 inhibits enteroviral replication by targeting a short region immediately downstream motif C in the non-structural protein 2C. *J Virol*. 2008a; 82: 4720–4730.

De Palma AM, Purstinger G, Wimmer E, Patick AK, Andries K, Rombaut B, De Clercq E, Neyts J. Comparative activity of a selected series of antipicornavirus compounds against poliovirus replication in vitro. *Emerg Infect Dis.* 2008b; 14: 545–551.

De Palma AM, Vliegen I, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev.* 2008c; 28: 823–884.

Domingo E. Viruses at the edge of adaptation. *Virology.* 2000; 270: 251–253.

Ehrenfeld E, Domingo E, Roos RP, Editors. (ed). *The picornaviruses.* ASM Press, Washington, DC. 2010.

Etchison D, Milburn SC, Edery I, Sonenberg N, Hershey JW. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor. *J Biol Chem.* 1982; 257(24): 14806-10.

Fitzgerald KD, Chase AJ, Cathcart AL, Tran GP, Semler BL. Viral Proteinase Requirements for the Nucleocytoplasmic Relocalization of Cellular Splicing Factor SRp20 during Picornavirus Infections. *J Virol.* 2013; 87 (5): 2390-400.

Flanegan JB, Petterson RF, Ambros V, Hewlett NJ, Baltimore D. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 961–965.

Flint SJ, Racaniello VR, Enquist LW, Skalka AM, Krug RM. *Principles of Virology.* ASM Press, Washington, DC. 2009; 3rd Ed.

Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Grosman Z, Nophar Y, Luria S, Sonenberg N, Kahana C. Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 1271-1277.

Gonçalves JLS, Hubinger MG, Santos NSO, Ferreira DF. Viroses do sistema nervoso central. In Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD do livro *Introdução à virologia humana*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2ª ed. 2008; 371–386.

Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett.* 2003; vol. 552, 1: 28–34.

Gustin KE. Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus Res.* 2003; 95(1-2): 35-44.

Harber JJ, Bradley J, Anderson CW, Wimmer E. Catalysis of poliovirus VP0 maturation cleavage is not mediated by serine 10 of VP2. *J Virol.* 1991; 65: 326-334.

Harris KS, Reddigari SR, Nicklin MJ, Hammerle T, Wimmer E. Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase. *J. Virol.* 1992; 66: 7481–7489.

Harvala H, Simmonds P. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J Clin Virol.* 2009; vol. 45: 1–9.

Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* 2002; 102: 4501-4523.

Hogle JM, Chow M, Filman DJ. The structure of poliovirus. *Sci Am.* Mar 1987; 256(3): 42-9.

Holland JJ, Kiehn ED. Specific cleavage of viral proteins as steps in the synthesis and maturation of enteroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968; 60: 1015-1022.

Holland JJ, Domingo E, De la Torre JC, Steinhauer DA. Mutation Frequencies at Defined Single Codon Sites in Vesicular Stomatitis Virus and Poliovirus Can Be Increased Only Slightly by Chemical Mutagenesis. *J Virol.* 1990; 64(8): 3960–3962.

Hughes AL. Phylogeny of the Picornaviridae and differential evolutionary divergence of picornavirus proteins. *Infect Genet Evolution.* 2004; 4 (2): 143-152.

Igarashi H, Yoshino Y, Miyazawa M, Horie H, Ohka S, Nomoto A. 2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. *J Virol.* 2010; vol. 84, 12: 5947–5957.

Iwasaki A, Welker R, Mueller S, Linehan M, Nomoto A, Wimmer E. Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: implications for poliovirus infection. *J. Infect.* 2002; 186 (5): 585– 592.

Jacobson MF, Baltimore D. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J Mol Biol.* 1968; 33: 369-378.

Kew OM, Yang C, Nottay B, Da Silva EE, Pallansch MA. The role of virologic surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. In Edouard Kuurstack, *Control of Virus Diseases*, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York. 1993; 215-246.

Kuechler E, Seipelt J, Liebig HD, Sommergruber W. Picornavirus proteinase-mediated shutoff of host cell translation: direct cleavage of a cellular initiation factor. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, Semler BL, Wimmer E, Eds., ASM Press, Washington, DC, USA. 2002; 301–311.

Kwong A D, Kim AD, Rao G. Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res.* 1998; 40: 1-18.

Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, Wimmer E. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74. 1977; 59–63.

Leong LEC, Cornell CT, Semler BL. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus polyproteins. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, Semler BL, Wimmer E, Eds., ASM Press, Washington, DC, USA. 2002; 187–198.

Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, Shih SR. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci.* 2009; 16:103.

Luo D, Xu T, Hunke C. Crystal structure of the NS3 Protease-Helicase from dengue virus. *J. Virol.* 2008; 173-183.

Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock. *Biology of Microorganisms* (8^o ed., International Edition). Prentice Hall, USA. 1997; 986.

Marcotte LL, Wass AB, Gohara DW, Pathak HB, Arnold JJ, Filman DJ, Cameron CE, Hogle JM. Crystal structure of Poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 2007; 81, 7: 3583-3596.

Matthews DA, Smith WW, Ferre RA, Condon B, Budahazi G, Sisson W, Villafranca JE, Janson CA, McElroy HE, Gribkov CL. Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin-like polypeptide fold, RNA-binding site, and means for cleaving precursor polyprotein. *Cell.* 1994; 77(5): 761-71.

Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases towards the NS2-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS.* 2007; 274: 2986-3002.

Melnick JL. Advantages and disadvantages of the killed and live poliomyelitis vaccines. *Bull. WHO.* 1978; 56: 21–38

Melnick JL. Live attenuated oral poliovirus vaccine. *Rev Infect Dis.* 1984; 6(2): 323-7.

Melnick JL. Current Status of Poliovirus Infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(3): 293-300.

Merilahti P, Koskinen S, Heikkila O, Karelehto E, Susi P. Endocytosis of Integrin-Binding Human Picornaviruses. *Adv Virol.* 2012; Article ID 547530: 1-9.

Milroy D, Featherstone J. Antiviral market overview. *Nat Rev Drug Disc.* 2002; 11-12.

Moldin JF. Poliomyelitis and poliovirus immunization. In Rotbart HA, *Human Enteroviruses Infection*, American Society for Microbiology, Washington. 1995; 195-215.

Moore M, Morens DM. Enteroviruses, including polioviruses. In Belshe RB, *Textbook of Human Virology*, PSG Publishing, USA. 1984; 407- 483.

Mosimann SC, Cherney MM, Sia S, Plotch S, James MN. Refined X-ray crystallographic structure of the poliovirus 3C gene product. *J Mol Biol.* 1997; 273(5): 1032–1047.

MS - Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias, Guia de bolso, 7ª edição revista, Brasília/DF. 2008.

MS - Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7ª edição. Brasília. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2009.

Nathanson N, Kew OM. From Emergence to Eradication: The Epidemiology of Poliomyelitis Deconstructed. *Am J Epidemiol.* 2010; 172: 1213–1229.

Nathanson N, Martin JR. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance, epidemicity, and disappearance. *Am. J. Epidemiol.* 1979; 110: 672–692.

Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol.* 2005; 79(12): 7698–7706.

Neurath H. The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon RJ, Bond JS. (Eds.). *Proteolytic enzymes - a practical approach*. Oxford: JRL Press. 1990. 259.

Neurath H. The versatility of proteolytic enzymes. *J Cell Bioch.* 1986; (32): 35-49.

Nomoto A, Kitamura N, Golini F, Wimmer E. The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74: 5345-5349.

Norder H, De Palma AM, Selisko B, Costenaro L, Papageorgiou N, Arnan C, Coutard B, Lantéz V, De Lamballerie X, Baronti C, Solà M, Tan J, Neyts J, Canard B, Coll M, Gorbalenya AE, Hilgenfeld R. Picornavirus non-structural proteins as targets for new anti-virals with broad activity. *Antiviral Res*. 2011; 89(3): 204-18. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.12.007. Epub 2011 Jan 12.

OMS. Polio laboratory manual - 4th edition. WHO/IVB. 2004

OMS - Organização Mundial da Saúde. 2012 - <http://www.polioeradication.org>

Pariente N, Airaksinen A, Domingo E. Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol*. 2003; 77: 7131–7138.

Patick AK, Binford SL, Brothers MA, Jackson RL, Ford CE, Diem MD, Maldonado F, Dragovich PS, Zhou R, Prins TJ, Fuhrman SA, Meador JW, Zalman LS, Matthews DA, Worland ST. In vitro antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999; 43, 2444–2450.

Patick AK, Brothers MA, Maldonado F, Binford S, Maldonado O, Fuhrman S. In vitro antiviral activity and single-dose pharmacokinetics in humans of a novel, orally bioavailable inhibitor of human rhinovirus 3C protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2267–75.

Patick AK. Rhinovirus chemotherapy. *Antiviral Res*. 2006; 71, 391–396.

Paul JR. 1971. *A History of Poliomyelitis*. New Haven, CT: Yale Univ. Press

Petersen JFW, Cherney MM, Liebig HD, Skern T, Kuechler E, James MNG. The structure of the 2A proteinase from a common cold virus. A proteinase responsible for the shut off of host cell protein synthesis. *Embo J*. 1999; 18. 5463-5475.

Phillips BA, Fennel R. Polypeptide composition of poliovirions, naturally occurring empty capsids, and 14S precursor particles. *J Virol.* 1973, 12: 291-299.

Prescott L., Harley J., Klein D. *Microbiology* (3^oed.). 1996. Wm. C. Brown, Boston, 935.

Racaniello VR, Ren R. Poliovirus biology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 206: 305–325.

Racaniello VR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In Howley P, Knipe D, (Eds.), *Fields virology*, Lippincott/Raven, Philadelphia, PA. 2001; 1: 685–722.

Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Viol.* 2006; 344: 9-16.

Racaniello VR. Virology Blog about viruses and viral disease [internet]. 2009. Acesso em agosto 2012. Disponível em: <http://www.virology.ws/2009/05/28/influenza-microneutralization-assay/>

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 1993; 290: 205-218.

Rawlings ND, Barrett AJ. Families of cysteine peptidases. *Meth Enzymol.* 1994; 244: 461-86.

Rawlings ND, Barrett AJ. Families of serine peptidases. *Meth Enzymol.* 1994; 244: 19-61.

Risi JB. The control of poliomyelitis in Brazil. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6 (Suppl. 2): S400–3.

Roberts L. The Polio Emergency. *Science.* 2012; 337: 514-516.

Rotbart HA, Kirkegaard K. Picornavirus pathogenesis: viral access, attachment, and entry into susceptible cells. *Semin Virol.* 1992; 3: 483–99.

Sabin AB. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use, and current strategies to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis.* 1985; 151: 420–36.

Schlegel A, Giddings TH Jr, Ladinsky MS, Kirkegaard K. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol.* 1996; 70(10): 6576-88.

Seipelt J, Guarne A, Bergmann E, James MNG, Sommergruber W, Fita I, Skern T. The structures of picornaviral proteinases. *Virus Res.* 1999; 62: 159-68.

Senior K. FDA panel rejects common cold treatment. *Lancet Infect.* 2002; Dis. 2, 264.
Serfling RE, Sherman IL. Poliomyelitis distribution in the United States. *Public Health Rep.* 1953; 68(5): 453–466.

Sharma R, Raychaudhuri S, Dasgupta A: Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Vir.* 2004; 320: 195-205.

Silva Jr FP, De Simone SG. Proteases como alvos de quimioterapia - Desenho de inibidores baseado na estrutura. *Biotec Ciência & Desenv.* 2001; 22: 12-17.

Skern TB, Hampolz A, Guarne. Structure and function of picornavirus proteinases. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, Semler BL, Wimmer E, Eds., ASM Press, Washington, DC, USA. 2002: 199–212.

Spector DH, Baltimore D. Requirement of 3'-terminal poly (adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1974; 71 (8): 2983–2987.

Stalkup JR, Chilukuri S. Enterovirus infections: a review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Dermatol Clin.* 2002; 20: 217–223.

Sutter RW, Kew OM, Cochi SL. Poliovirus vaccine: live. 2004; 151a.: 651-705

Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol.* 2013; 14: 282-93.

Teterina NL, Gorbalenya AE, Egger D, Bienz K, Ehrenfeld E. Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol.* 1997; 71: 8962-8972.

Thompson A, Patel K, Mchutchison JC. Directly acting antivirals for treatment of patients with hepatitis C infection: a clinical development update addressing key future challenges. *J. Hepatol.* 2009; 50: 184-194.

Tong L. Viral proteases. *Chem Rev.* 2002; 102 (12): 4609–4626.

Toyoda H, Nicklin MJ, Murray MG, Anderson CW, Dunn JJ, Studier FW, Wimmer E: A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell.* 1986; 45: 761-770.

Tremacoldi CR. Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Planta Contra Pragas. *Embrapa ISSN 1983-0513.* 2009; 353: 09-33.

Tuthill TJ, GropPELLI E, Hogle JM, Rowlands DJ. Picornaviruses. *Curr Top Microb Immunol.* 2010; 343: 43–89.

Walker, M. A. Hepatitis C Virus: An overview of current approaches and progress. *Drug Discov Tod.* 1999; 4: 518-529.

Wells VR, Plotch SJ, De Stefano JJ. Determination of the mutation rate of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Res.* 2001; 74: 119–132.

White DO, Fenner FJ. *Medical Virology.* 4 ed. Edited by San Diego: Academic, 1994; 603.

Wigg MD. Antivirais. In Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD do livro *Introdução à virologia humana*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2ª ed. 2008; 117 – 146.

Wimmer E. Genome-linked proteins of viruses. *Cell*. 1982, 28: 199-201.

Wimmer E, Hellen CUT, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*. 1993; 27: 353-436.

Yaunner RS. Síntese de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico como inibidores potenciais de proteases [dissertação]. Rio de Janeiro: UFRJ; 2010.

Yaunner RS, Barros JC, Silva JFM, Antunes OAC. Síntese e avaliação farmacológica de pseudopeptídeos derivados do ácido tartárico como inibidores potenciais de proteases. [Apresentação de Trabalho/Congresso]. SBQ. 2011.

Younessi P, Jans DA, Ghildyal R. Modulation of host cell nucleocytoplasmic trafficking during Picornavirus infection. *Infect Disorders–Drug Targ*. 2012; 12: 59-67.

Ypma-Wong MF, Dewalt PG, Johnson VH, Lamb JG, Semler BL: Protein3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*. 1988; 166: 265-270.

Zamora M, Marissen WE, Lloyd RE. Multiple eIF4G1-specific protease activities present in uninfected and poliovirus-infected cells. *J. Virol*. 2002; 76, 165–177.