

Segunda-feira, 20 de novembro de 2006.
Profa. Sônia.

Agentes antivirais.

Substâncias químicas usadas mais especificamente para o tratamento de viroses.

Não serão abordados todos os produtos: será chamada a atenção de grupos e agentes mais importantes. Assim, serão mencionados aqueles com relevância clínica porque existem muitos produtos com eficácia laboratorial que ainda estão em fases de estudo para aplicação nos seres humanos. E ainda outros tantos que não possuem eficácia em humanos.

Etapas de desenvolvimento de um antiviral

1. Fase pré-clínica

- a) Em cultura de células - avalia a citotoxicidade, a atividade antiviral e o mecanismo de ação da droga.
- b) Em animais – avalia a concentração não tóxica e os efeitos teratogênicos e carcinogênicos.

2. Fase clínica – testes em humanos

1ª etapa – duplo cego em pessoas sadias – estuda a farmacologia, da administração até a excreção (concentração, meia vida e órgãos afetados).

2ª etapa – em poucos pacientes. Se os resultados são satisfatórios evoluem para a próxima etapa.

3ª etapa – centenas a milhares de pacientes. Avalia a segurança do medicamento a longo prazo.

Este estudo leva cerca de 10 anos e só então, se aprovada nos testes, a droga será liberada para uso clínico.

Estes estudos avaliam eficácia e efeitos tóxicos toleráveis uma vez que todas as drogas possuem efeitos tóxicos.

Sítio-alvo e mecanismo de ação do antiviral

As drogas atuam sobre parasitas intracelulares obrigatórios, os quais possuem uma relação muito íntima com as células hospedeiras. Desse modo, atuar na partícula viral envolve risco de atuar sobre a célula e lesá-la.

As drogas de escolha são as que atuam em estruturas do vírus que sejam um pouco independente da célula hospedeira: enzimas de replicação do ácido nucléico (afeta também enzimas celulares, mas a enzima viral possui maior afinidade pelo antiviral e é mais atacada), enzimas próprias da partícula viral, etc.

A) Na Adsorção (primeira etapa da replicação viral – ligação da partícula viral a um receptor específico da célula hospedeira).

Obs:

- Terceira etapa: o desnudamento do vírus que corresponde perda do capsídeo viral.
- Quarta etapa: liberação do ácido nucléico que possui todas informações para formação de novas partículas. Alguns vírus já trazem enzimas prontas (polimerases) para replicação do ácido nucléico.
- A seguir, segue-se replicação → síntese de proteínas estruturais → montagem ou maturação do vírus (se o vírus tem envelope ou não).

1. **Anticorpos neutralizantes:** os anticorpos se ligam a estruturas de superfície dos vírus, que são exatamente aquelas que são importantes para ligação do vírus à superfície celular. Os anticorpos podem ser formados ativamente nas infecções, nas vacinas e por meio da inoculação. Os anticorpos mais importantes são os que vieram de pacientes em convalescença da doença específica porque estes estão com títulos circulantes mais altos. Usados na hepatite A. Apresentam risco de contaminantes com vírus que não foram reconhecidos. A fração gama-globulina especificamente não possui uma segurança grande. Os anticorpos monoclonais são muito mais seguros e são dirigidos para determinados antígenos e tem mais aplicações clínicas.

2. **Receptores solúveis:** receptores análogos aos dos vírus. Uma molécula de CD4 inibiria a adsorção porque se ligaria à partícula viral e impediria a interação com as células hospedeira. Não foram aprovados para uso terapêutico.

PVR, ICAM-1 e CD4 “in vitro”, para poliovírus, rinovírus e HIV-1, respectivamente.

Isolados primários nem sempre são sensíveis e há seleção de resistentes. Desse modo, os vírus podem não se ligar a estruturas que se ligavam anteriormente.

3. **Peptídeos inibidores sintéticos** (pequenos peptídeos)

T20 (Fuseon) para HIV-1, bloqueia após ligação ao receptor e antagoniza a função do co-receptor (altera a conformação da gp41, necessária para fusão).

Mutantes surgem, daí a terapia combinada.

O T20 é licenciado para uso no tratamento do HIV. Sempre associado com outras drogas (terapia combinada) porque é susceptível a mutações. Ele bloqueia a ligação ao receptor e altera o co-receptor.

B) Na penetração e desnudamento

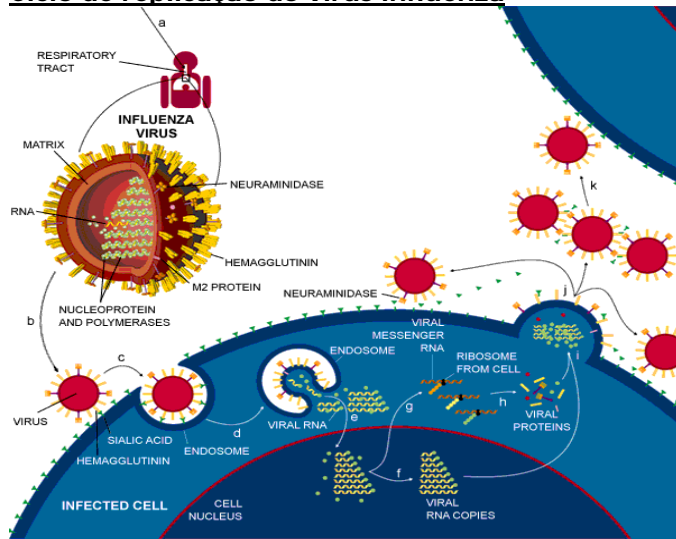
1. **Amantadina e rimantadina** (aminas sintéticas) – Usadas no vírus Influenza A (a substância bloqueia o canal iônico da proteína M2. A proteína M2 é um canal iônico de prótons e propicia que o ambiente dentro da vesícula endocítica fique mais ácido. As aminas alcalinizam o meio e impedem liberação do vírus). Uso profilático. Atualmente está em desuso. Usadas em aerossóis ou ingeridas. O Influenza A é uma das maiores causas de pandemia e estas drogas não atuam contra os vírus B e C.

Resistência em influenza A – mutação da proteína M2. A/H5N1 resistência natural.

2. **Pleconaril** – inibe as funções do capsídeo em enterovírus e rinovírus.

3. **Palivizumab** – anticorpo monoclonal contra a proteína de fusão do vírus respiratório sincial – VRS (atividade neutralizante e inibidora da fusão). Previne infecção severa em crianças muito jovens. **Deveria estar no item adsorção.**

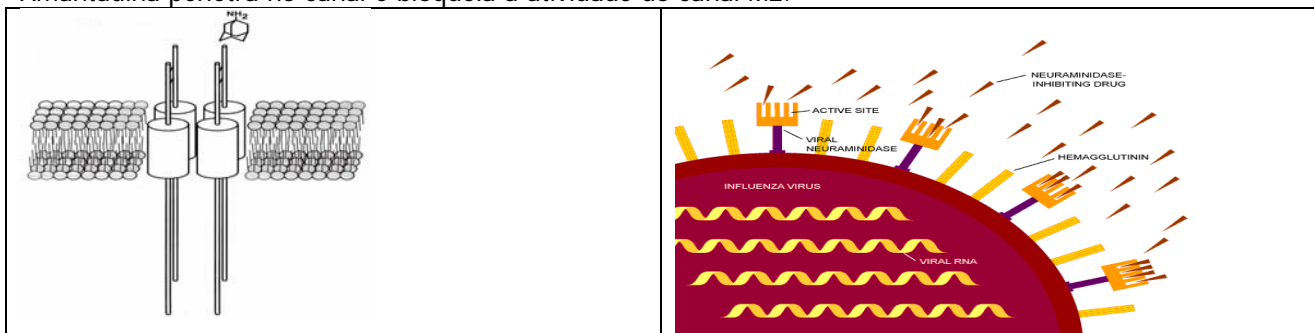
Ciclo de replicação do vírus influenza



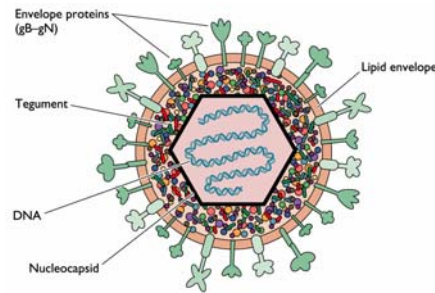
O vírus localiza-se no TRS. Ele possui 8 segmentos de RNA e envelope. Neste existem projeções importantes funcionalmente falando: uma das espículas possui atividade de neuraminidase (facilita penetração e principalmente disseminação porque rompe resíduos de ácido siálico) e outra atividade de hemaglutinina (responsável pela ligação com o receptor). Também existem as proteínas M1 e M2 do envelope. O vírus penetraria na célula por endocitose, ficaria dentro de uma vesícula, quando a proteína M2 acidificaria o meio e liberaria os RNA do vírus. Neste momento a droga agiria.

Drogas inibidoras do ciclo de replicação de influenza vírus

Amantadina penetra no canal e bloqueia a atividade do canal M2.



Partícula do hepesvirus

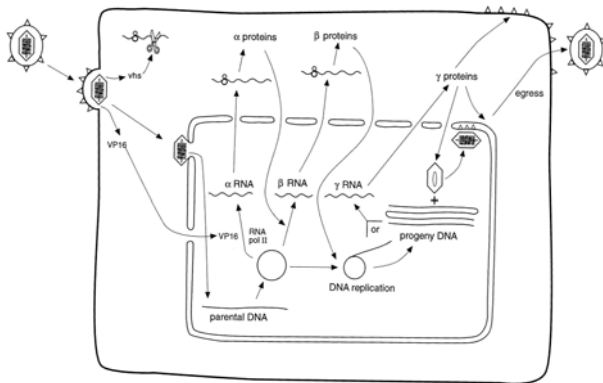


Pode ser o herpes simples ou outros vírus herpes: a ME não distingue um do outro.

O ácido nucléico é DNA e o capsídeo icosaédrico. Há envelope.

Tegumento: entre o capsídeo e o envelope viral nos herpesvírus: possuem muitas proteínas que participam na replicação viral. Umas degradam DNA humano.

O vírus se funde com a membrana da célula hospedeira e libera as proteínas solúveis do tegumento dentro da célula (VHS e VP16 – que ao atuar na RNAPolimerase, inibe a produção de RNAm humano). O DNA viral é liberado a partir do capsídeo pelo poro da membrana nuclear. Este DNA contém genes que codificam várias seqüências de produção de proteínas. A seguir, ocorre síntese de DNA e proteínas (alfa, beta e gama). Existem drogas que agem na DNA polimerase e impede a síntese de mais DNA.



Ciclo de Replicação dos Herpesvírus

C) Na transcrição e replicação de ácidos nucléicos virais

Na DNA polimerase dos Herpesvírus

Análogos de nucleosídeos

a) Trifuridina, iododesoxiuridina (IDU)

b) Drogas monofosforiladas pela timidocinase viral (HSV e VZV) e trifosfatada por cinases celulares:

os outros dois fosfatos são adicionados por cinases celulares. As drogas entram no lugar de trifosfatos e incorporam o nucleosídeo natural no lugar deles. Daí por diante não continua o prolongamento da cadeia. Aciclovir – análogo da guanósina. Para HSV. Entra no lugar da desoxiguanósina e impede o alongamento da cadeia.

Valaciclovir (éster valina do aciclovir) – melhor absorção e biodisponibilidade. Usado para Varicela e Zoster (VZV).

Fanciclovir (derivado do penciclovir) – ativo em HSV, VZV, queda de EGBV e CMV.

c) Ganciclovir (derivado do aciclovir) – monofosfatado pela fosfotransferase codificada pelo gene UL97 do CMV (atua em células infectadas e não infectadas – maior toxicidade) – uso em retinite CMV.

As drogas dos itens a e b só atuam em células infectadas e possuem menos efeitos tóxicos: são comparadas às penicilinas das bactérias (atuam sobre as células infectadas e não sobre as sadias). A droga do item c atua tanto em células infectadas quanto em células não infectadas e, desse modo, possui mais efeitos tóxicos.

Ribavirina: análogo de guanósina trifosfato. Inibe a síntese de ácido nucléico, além de impedir o capping do RNAm. Ativa em muitos vírus DNA e RNA (HSV – herpes simples vírus, HCV, Sarampo, caxumbo, febre lassa e RSV – respiratório sincial vírus).

Usada em RSV em aerossóis e na hepatite C (com INF).

Análogo do pirofosfato

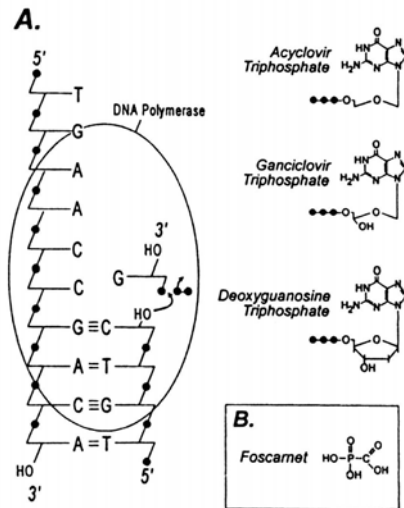
Foscarnet (ácido fosfonofórmico): liga-se ao sítio de ligação do pirofosfato da enzima DNA polimerase (inibição não competitiva na ligação dos nucleosídeos).

- retinite CMV (em aids) e HSV e VZV – varicela zoster - invasivas severas.

Baixa disponibilidade. Uso endovenoso. Lesão renal.

Análogo do nucleotídeo (desoxicitina monofosfato): já vem com um fosfato e no organismo recebe dois fosfatos pelas enzimas celulares.

Cidofovir – em CMV, retarda a retinite (nefrotóxico).



Mecanismo de ação sobre a DNA polimerase dos Herpesvirus.

Resistência aos análogos de nucleosídeos**Mutantes resistentes ao aciclovir – em 2 genes (dTK e DNA pol)**

Mutantes TK são ineficientes na reativação da latência. Mas, TK celulares substituem a TK viral e replica HSV. Portanto mutantes da TK do HSV são patogênicos (em imunodeprimidos principalmente) e resistentes ao aciclovir, penciclovir e fanciclovir. Mantêm suscetibilidade ao foscarnet.

Fenótipos da mutação TK:

- Mutante TK negativa – atividade enzimática abolida. Não ocorre fosforilação do aciclovir.
- Mutante produtora de baixa atividade TK (atividade enzimática não abolida).
- Mutante com TK alterada – fosforila timidina, mas não o aciclovir.

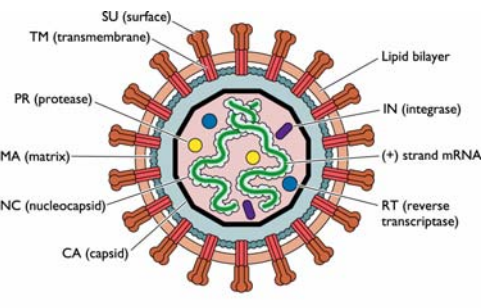
Mutante DNA polimerase

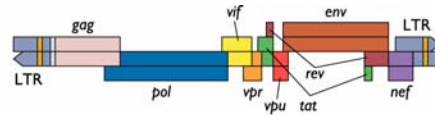
Infrequente e tem sido relatada em imunodeprimidos.

A enzima é ativa em presença de altas concentrações de Aciclovir trifosfato e também resistente a outras drogas, como também ao ácido fosfonoacético.

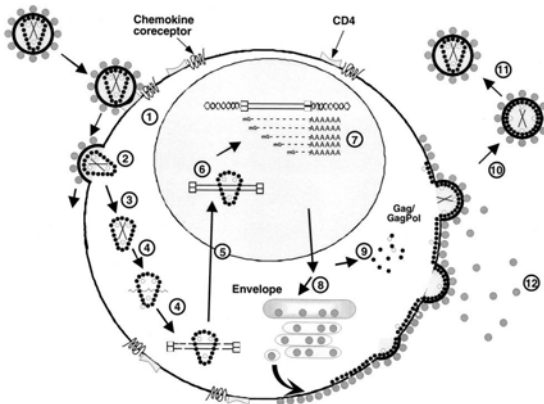
Resistência ao Ganciclovir

Mutação no gene UL97 do CMV. Não resistente ao Aciclovir, mas resistente ao Cidofovir.

Partícula do HIV e seu genoma



A partícula do HIV é constituída de RNA e possui TR. Existem glicoproteínas que são projeções do envelope. Na realidade o genoma desse vírus tem várias seqüências importantes como gag (codifica proteínas estruturas), pol (polimerase viral – TR) e env (proteínas do envelope).



Replicação do HIV: o LTCD4, células dendríticas e outras células são os alvos do HIV. No LT há o receptor CD4 e a glicoproteína GP120 que faz a adsorção a esse receptor. A GP41 funciona na ligação a um co-receptor que é uma quimiocina. A seguir, o vírus é endocitado e o DNA é formado por meio da TR. O DNA funciona codificando várias proteínas do vírus. O vírus é montado, as glicoproteínas de superfície são glicosiladas e o parasita sai por exocitose (brotamento).

O vírus não sai completo: possui poli-proteínas que não foram clivadas em proteínas funcionais com atividade específica. É nessa etapa que funciona a protease do HIV.

D) Inibidores da TR (RT)

Análogos nucleosídeos

Azidotimidina (AZT), Dideoxinosina (ddI), Dideoxicitidina (ddC), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC) e Abacavir (ziagen).

Drogas trifosforiladas completamente por enzimas celulares.

AZT (pirimidina sintética análoga). AZT-TP difere da timidina na posição 3' do anel desoxirribose. 100 x mais ativa para RT HIV-1 do que para DNA polimerases celulares.

Todas inibem RT do HIV-1, mas apresentam efeitos colaterais mais intensos do que os anteriores (cefaléia, náuseas, mialgia, febre, diarréia, neuropatia periférica, etc).

Análogos não-nucleosídeos

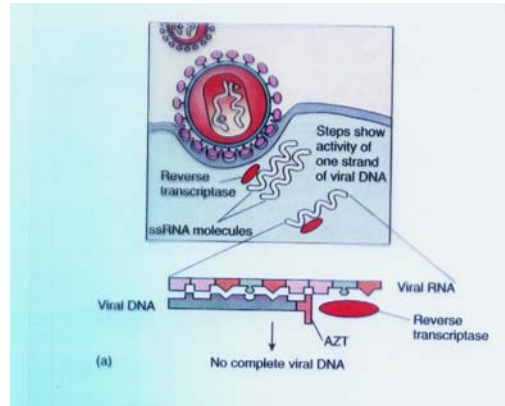
Nevirapina (viramune), delavirdina (rescriptor), efavirenz (sustiva).

Não se incorporam ao DNA, ao contrário dos anteriores. Inibem replicação do HIV-1 por ligação à enzima em sítio diferente do usado pelo substrato.

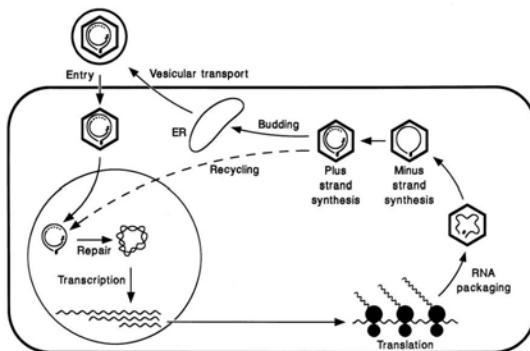
Mutação única na RT leva à resistência a estas drogas. Mecanismo de resistência diferente daquele dos análogos de nucleosídeos. Têm aplicação clínica em associação com estes.

Nevirapina previne a transmissão vertical (mas AZT é melhor).

Efeitos colaterais são erupção cutânea, elevação de aminotransferases, cefaléia e sintomas neurológicos.



Replicação do HBV (o HBV não é retrovírus, é DNA vírus, mas possui RT)



Inibidores da TR do HBV

DNA polimerase do HBV e a RT do HIV têm semelhanças: drogas que inibem RT do HIV também inibem função da RT do HBV e a replicação do HBV.

Lamivudina (3TC) é um efetivo inibidor. Usada em hepatite B crônica.

Resistência surge em tratamentos de 1 ano ou mais.

Vírus mutante – mutação em região altamente conservada (M552V) no centro catalítico. Mutações adicionais no códon 526 da polimerase – restaura replicação

Adefovir, análogo de nucleotídeo (contém grupo fosfato) e é fosforilado a trisfosfato por enzimas celulares. É inibidor da RT-HIV e da replicação do DNA do HBV. Mutantes HBV (mutação M552V) que apresentam resistência ao 3TC, ainda são sensíveis ao Adefovir.

Em determinados vírus, incluindo HIV, HBV, HCV, a resposta a antivirais é variável e depende do genótipo viral (grupos e/ou subtipos).

E) Na síntese de proteína

Fomivirsen sódico – fosforionato oligonucleotídeo (oligonucleotídeo antisense ou de sentido contrário) liga-se ao RNA transcrito e impede o processamento do RNAm no núcleo. Tem sequência complementar à do RNAm referente ao gene inicial imediato 2 (IE2) do CMV.

É a mais ativa das drogas anti CMV, e de pequenos efeitos colaterais.

Interferon alfa (os outros funcionam nas infecções naturais)

Interferons são glicoproteínas da família das citocinas codificadas pelo hospedeiro, que inibem a replicação viral. Usado em hepatites B e C crônicas e em verrugas por papilomavírus.

Atualmente interferon-alfa recombinante. Ativa determinado gene que é transcrito em RNm, que por sua vez, é traduzido em proteína que interfere com a replicação viral (estado antiviral).

Principais efeitos em duas enzimas: 2'-5'-oligoadenilato sintetase, que ativa uma endonuclease (degrada o RNAm viral; proteinocinase específica para o fator de iniciação ribossomal (eIF-2), que fosforila e inativa o RNAm viral e conseqüentemente inibe a síntese de proteínas virais).

Também inibem síntese de proteínas humanas → efeitos colaterais (???)

(LER) Atuação dos interferon: uma quinase é ativada por RNA de dupla ou de simples fita e sofre ação do interferon alfa. Outro alvo do Interferon é a oligoadenilato sintetase. LER.

Ver imagem no slide.

F) No processamento de proteínas

Utilizados no HIV. Já foram utilizados no HCV e em outros vírus nos quais não mostraram efeitos.

Inibidores da protease do HIV

HIV é liberado da célula na forma imatura, ou seja, com os precursores de proteínas do capsídeo e enzimas ainda não clivados.

Somente no meio extra-celular a protease viral (parte da gp160, sofre auto-ativação e inicia a clivagem das outras proteínas que constituem a poliproteína p160 e a poliproteína p55, tornando o vírus infeccioso).

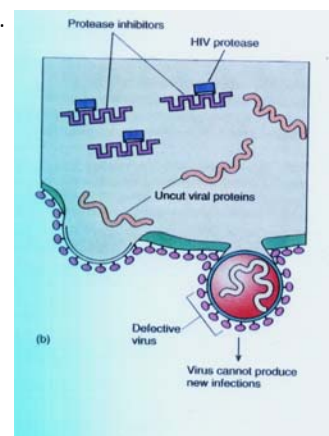
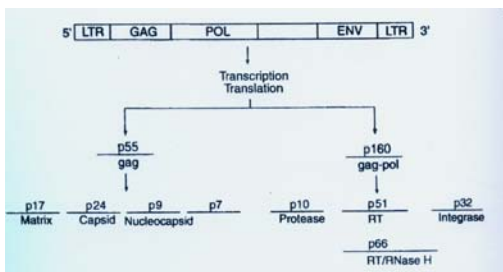
Os inibidores de protease têm uma estrutura química semelhante à região do substrato natural que é clivado pela enzima.

São eles: saquinavir (invirase), indinavir (crixivan), ritonavir (norvir), nelfanavir (viracept), amprenavir (agenerase) e Lopinavir.

Genoma do HIV e suas poliproteínas p55 e p160:

Essas poliproteínas deveriam ser cortadas. A p160 possui a protease e se autocliva.

Os inibidores se ligam nas enzimas e impedem quebra das poliproteínas.



G) Na liberação da partícula viral

Oseltamivir e Zanamivir: úteis no tratamento de influenza. Inibem a neuroaminidase. Ativas tanto para IA quanto para IB.

São análogos do ácido siálico e inibem a neuroaminidase dos vírus Influenza A e B. Ligam-se em regiões diferentes do sítio ativo da neuraminidase.

A neuraminidase do influenza cliva resíduos terminais de ácido siálico, destruindo os receptores da hemaglutinina viral e permite a disseminação do vírus no TR.

Uma mutação no sítio catalítico da neuraminidase produz resistência a estas drogas.

São muito mais ativos que amantadina.

Zanamivir é usado IV e aerossóis.

Oseltamivir (pró-droga) de biodisponibilidade oral.