

Ana Cláudia Silva Braga

Inibição do vírus da hepatite C utilizando siRNAs direcionados para
o genoma viral e proteínas celulares Hsps

São José do Rio Preto
2013

Ana Cláudia Silva Braga

Inibição do vírus da hepatite C utilizando siRNAs direcionados para
o genoma viral e proteínas celulares Hsps

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a Paula Rahal

Co-orientador: Dr. Bruno Moreira Carneiro

São José do Rio Preto
2013

Ana Cláudia Silva Braga

Inibição do vírus da hepatite C utilizando siRNAs direcionados para o genoma viral e proteínas celulares Hsps

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

1º Examinador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho Mello
Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

São José do Rio Preto, 23 de Agosto de 2013.

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À Raquel Aparecida da Silva, uma pessoa maravilhosa que tenho o privilégio de chamar de Mãe. Obrigada por toda garra, coragem e pelos valiosos ensinamentos.

Agradecimentos...

- À minha orientadora Prof^a Dr^a Paula Rahal por toda atenção, paciência e sabedoria. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do seu grupo e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais nestes anos de convivência.
- Ao meu co-orientador Bruno Moreira Carneiro pela paciência, dedicação e conhecimentos transmitidos. Obrigada por toda atenção e apoio despendidos mesmo nos períodos em que estive fora do país.
- À amiga e companheira de laboratório Mariana Nogueira Batista por caminhar e dividir comigo todos os momentos de aprendizagem.
- À toda equipe do Laboratório de Estudos Genômicos, Lenira, Pós-doutorandos, Doutorandos, Mestrandos, alunos de Iniciação Científica e Estágio Básico, por toda ajuda pessoal e profissional. Todos vocês tornam o convívio do trabalho uma tarefa muito mais agradável e divertida.
- Aos docentes do curso de Graduação e Pós-Graduação da Unesp de São José do Rio Preto. Obrigada pela oportunidade e pelo privilégio de ter sido aluna dos professores mais renomados do país.
- Aos meus pais Cláudio e Raquel por todo empenho, dedicação e sacrifício. Sem vocês absolutamente nada disso seria possível.
- Aos colegas da turma de Ciências Biológicas pela companhia, força e amizade.
- Às minhas amigas e companheiras de república Ana Beatriz e Natalia, pela paciência e companheirismo.
- Aos meus familiares pelo apoio constante.

- Às amigas de turma Carol, Déia, Lari e Jú, por me proporcionarem momentos inesquecíveis. Obrigada pela grande amizade.
- Aos meus amigos Plínio, Tadeu e Thiago, por toda bagunça e companheirismo.
- Aos meus amigos de Taquaritinga pela amizade e diversão. Muito obrigada por me acolherem nessa imensa família.
- Ao meu namorado Arthur por todo companheirismo, paciência e amor. Obrigada por fazer parte da minha vida e dividir comigo estes momentos especiais.
- Ao apoio financeiro da Capes e FAPESP (número de processo 2011/15796-4).
- A Deus, por trilhar nossos caminhos e abençoar nossas vidas.

Epígrafe



VOU ME DIVERTIR PRA CARAMBA, ENQUANTO VOCÊ FICA AÍ SENTADO, BOCEJANDO E DESEJANDO ESTAR...



Por Bill Watterson.

RESUMO

A hepatite C é consequência da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas em todo o mundo estejam cronicamente infectadas. Estudos têm demonstrado interações entre proteínas virais e do hospedeiro durante o ciclo de replicação do HCV e estas interações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas terapias contra a hepatite C. As proteínas de choque térmico (Hsp) são proteínas celulares que interagem com proteínas do HCV e a inibição destas proteínas poderiam reduzir a replicação viral. Neste estudo, as proteínas celulares Hsp90 e Hsp27 foram inibidas por siRNA isoladamente ou em combinação com a inibição das regiões virais 5'UTR, NS3 e NS5A. Foi utilizada uma cultura celular estável Huh7 expressando um replicon subgenômico do HCV e todas as moléculas de siRNA dirigidas ao genoma do vírus mostraram eficiência na redução da replicação viral. A melhor resposta foi obtida pelo siRNA 5'UTR, que apresentou bons resultados também nos estudos à longo prazo. A inibição da proteína celular Hsp27 aumentou os níveis de replicação do vírus, entretanto a supressão de Hsp90 mostrou redução da replicação viral e a utilização desta molécula juntamente com a molécula de siRNA dirigida para 5'UTR mostraram uma diminuição de mais de 90% da replicação viral. Entretanto a inibição prolongada de Hsp90 levou à morte celular, evidenciando o importante papel desta proteína na sobrevivência das células. Portanto o presente trabalho sugere que a terapia combinada de siRNAs pode ser uma alternativa eficiente no combate à hepatite C em pacientes com HCC uma vez que a inibição de Hsp90 atua tanto na supressão tumoral quanto na replicação do HCV.

Palavras-chave: HCV, RNAi, proteínas de choque térmico, Hsp90 e Hsp27.

ABSTRACT

Hepatitis C is a consequence of infection by hepatitis C virus (HCV) and it is estimated that approximately 150 million people are chronically infected worldwide. Several studies have demonstrated interactions between viral and host proteins during the HCV replication cycle and these interactions might be used for development of new therapies against hepatitis C. The heat shock proteins (Hsp) are cellular proteins that interact with proteins of HCV and inhibition of these proteins could reduce viral replication. In this study, cellular proteins Hsp90 and Hsp27 were inhibited by siRNA targeting the mRNA of these proteins in combination with siRNA to viral 5'UTR region, NS3 and NS5A. We used a stable cell line expressing HCV subgenomic replicon and all siRNA molecules targeting the viral genome showed effectiveness in reducing viral replication. The best response was achieved by siRNA 5'UTR, which showed good results on long term studies. The inhibition of cellular protein Hsp27 increased virus replication, but knockdown of Hsp90 showed reduced viral replication. Use of this molecule together with the siRNA molecule directed to 5'UTR showed a decrease of more than 90% viral replication. However, the prolonged inhibition of Hsp90 led to cell death, demonstrating the important role of this protein in cell survival. Finally this work suggests that the combination therapy of siRNAs can be an effective alternative to treat hepatitis C in patients with HCC since reduction of Hsp90 expression is effective on tumor suppression and in HCV replication.

Keywords: HCV, RNAi, heat shock proteins, Hsp90 and Hsp27.

Sumário

<i>Capítulo I</i>	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Histórico e epidemiologia	14
1.2 Patologia e tratamento	16
1.3 Vírus da hepatite C	19
1.4 RNA de interferência	24
1.5 Proteínas de choque térmico	27
1.6 Estudos <i>in vitro</i> da hepatite C	29
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivos gerais.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
<i>Capítulo II</i>	43
1 ARTIGO CIENTÍFICO	44
1.1 Introduction.....	45
1.2 Materials and methods	46
1.3 Results	50
1.4 Discussion.....	52
1.5 References.....	54
<i>Capítulo III</i>	62
1 DISCUSSÃO	63
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- 17-AAG: 17-*N*-alilamino-17-demetoxigeldanamicina
- 17-DMAG: 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoiygeldanamicina
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- C: proteína do core, do inglês *core protein*
- CD81: receptor celular, do inglês *Cluster of Differentiation 81*
- cDNA: DNA complementar, do inglês *complementary DNA*
- DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DEPC: dietilpirocarbonato
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
- dNTP: desoxirribonucleotídeos 5'-trifosfatados
- dsRNA: fita dupla de RNA, do inglês *doubre-stranded RNA*
- E. coli*: bactéria *Escherichia coli*
- E1: proteína do envelope 1 do vírus da hepatite C
- E2: proteína do envelope 2 do vírus da hepatite C
- EMCV: vírus da encefalomiocardite, do inglês *encephalomyocarditis virus*
- G418: antibiótico genético
- GA: geldanamicina
- GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HBV: vírus da hepatite B, do inglês *hepatitis B virus*
- HCC: carcinoma hepatocelular, do inglês *Hepatocellular Carcinoma*
- HCV: vírus da hepatite C, do inglês *hepatitis C virus*
- HIV: vírus da imunodeficiência humana, do inglês *human immunodeficiency virus*
- HSP: proteínas de choque térmico, do inglês *heat shock proteins*
- HSV-2: vírus herpes simplex 2, do inglês *Herpes simplex virus 2*
- INF: interferon
- IP: inibidor de protease
- IRES: sítio interno de entrada ribossomal, do inglês *Internal Ribosomal Entry Site*
- kDa: unidade de massa kilodalton
- LB: Luria-Bertani broth
- MgCl₂: cloreto de magnésio

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NANB: hepatite não-a-não-b

NS: proteínas não estruturais, do inglês *non structural*

NT: nucleotídeo

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: fase aberta de leitura, do inglês *Opening Reading Frame*

Pb: par de bases

PBS: tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PCR: reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PEG: polietilenoglicol, do inglês *polyethylene glycol*

PEG-IFN: interferon peguulado

pH: potencial hidrogeniônico

pSGR-JFH1: replicon subgenômico, do inglês *subgenomic replicon*

Japanese Fulminant Hepatitis 1

PVDF: fluoreto de polivinilideno, do inglês *polyvinylidene difluoride*

qPCR: PCR em tempo real, do inglês *quantitative PCR*

RBV: ribavirina

RE: retículo endoplasmático

RISC: complexo de silenciamento, do inglês *RNA-induced silencing complex*

RNA: ácido ribonucléico

RNAi: RNA de interferência

rpm: rotações por minuto

RSV: vírus respiratório sincicial, do inglês *Respiratory Syncytial Virus*

SARS: síndrome respiratória aguda grave, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SDS: dodecilsulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*

SFB: soro fetal bovino

shRNA: do inglês *short hairpin RNA*

siRNA: do inglês *short interfering RNA*

TBS-T: tampão salino, do inglês *Tris-Buffered Saline and Tween 20*

UTR: região não traduzível, do inglês *untranslated region*

V: unidade de voltagem elétrica, Volt

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia

A Hepatite C é uma doença causada pela infecção do vírus da hepatite C (HCV) e estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus em todo o mundo (LAVANCHY, 2011). A cada ano, de três a quatro milhões de novos pacientes são diagnosticados com o vírus e em muitos países a doença é endêmica (BUTT, 2005; KOZIEL; PETERS, 2007; SORIANO; PETERS; ZEUZEM, 2009).

O vírus da hepatite C foi identificado por CHOO et al. (1989) como o agente etiológico da doença designada anteriormente por “hepatite não-a-não-b (NANB)”, que representava 90% dos casos de hepatites pós transfusionais. O nome NANB foi utilizado de 1975 até 1989, quando a partir da identificação do HCV se estabeleceu o termo Hepatite C (CHOO et al., 1989; ALTER; HOUGHTON, 2000).

Até 1992 a via de infecção mais comum era por meio de transfusões sanguíneas, uma vez que os bancos de sangue não realizavam triagens para este vírus (BUSCH et al., 2005). Atualmente os principais fatores de risco são a utilização de drogas injetáveis, tatuagens, exposição ocupacional e hemodiálise (ALTER, 2011). A transmissão sexual ainda é uma questão controversa entre os pesquisadores, mas o que se observa é que esta via é possivelmente menos eficiente para o vírus da hepatite C que para outros vírus como o HBV e o HIV (TERRAULT, 2002; TOHME; HOLMBERG, 2012). Apesar de extensas investigações, em aproximadamente 40% dos casos de infecção pelo HCV os fatores de risco ainda são desconhecidos (SHEPARD; FINELLI; ALTER, 2005; INDOLFI; NESI; RESTI, 2013). O teste para a hepatite C geralmente é realizado em pacientes que apresentem ao menos um dos fatores de risco citados acima. Parceiros sexuais atuais de pessoas com infecção pelo HCV também devem realizar o teste (TALWANI et al., 2012).

As políticas de saúde e saneamento adotadas pelos países estão relacionadas com a prevalência e distribuição da hepatite C pelo mundo. Nos países do norte europeu essa prevalência é relativamente baixa (menos de 1%), mas observam-se índices superiores a 3% em regiões rurais da Grécia, Itália e Rússia (CORNBURG et al., 2011). A maioria dos países apresenta taxas de prevalência de 1 a 2%, entretanto vários apresentam taxas relativamente altas, como o Egito (15%), Paquistão (4,7%) e Taiwan (4,4%). Essas diferenças são explicadas principalmente pela variabilidade nas vias de transmissão ou por medidas de saúde pública locais (NEGRO; ALBERTI, 2011). Estudos realizados no Brasil demonstraram uma

prevalência do vírus de 0,62% na região Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul (PALTANIN; REICHE, 2002; ANDRADE et al., 2006).

Analisando-se sequências do HCV obtidas de indivíduos em regiões geográficas distintas observou-se a existência de pelo menos sete grupos geneticamente distintos, denominados genótipos (de 1 a 7) (KUIKEN; SIMMONDS, 2009). Considerando o genoma completo, os grupos diferem entre 30-35% entre os sítios de nucleotídeos, com maior variabilidade em alguns genes como E1 e E2, e sequências mais conservadas no Core e na proteína não estrutural NS3. A região de menor variabilidade no genoma do HCV entre os genótipos é encontrada na região 5'UTR (DI BISCEGLIE; HOOFNAGLE, 2002). Cada genótipo possui vários subtipos, identificados por letras minúsculas (a, b, c etc), que diferem entre si em 20-25% na sequência de nucleotídeos (PAWLOTSKY, 2003; SIMMONDS, 2004).

Os genótipos 1, 2 e 3 são amplamente distribuídos por todo o EUA, Europa, Austrália e Leste da Ásia (Japão, Tailândia e China). O genótipo 4 é normalmente identificado no Oriente Médio, Egito e África Central. Os genótipos 5 e 6 encontram-se predominantemente na África do Sul e Sudeste da Ásia, respectivamente (SIMMONDS, 1997; AGHA et al., 2004; LEE et al., 2006). No Brasil, o genótipo 1 é o mais prevalente, seguido pelo genótipo 3 (Figura 1) (PERONE et al., 2008). O genótipo 7 foi recentemente descoberto por NAKANO et al. (2012) e ainda não existem estudos epidemiológicos referentes à esse genótipo.

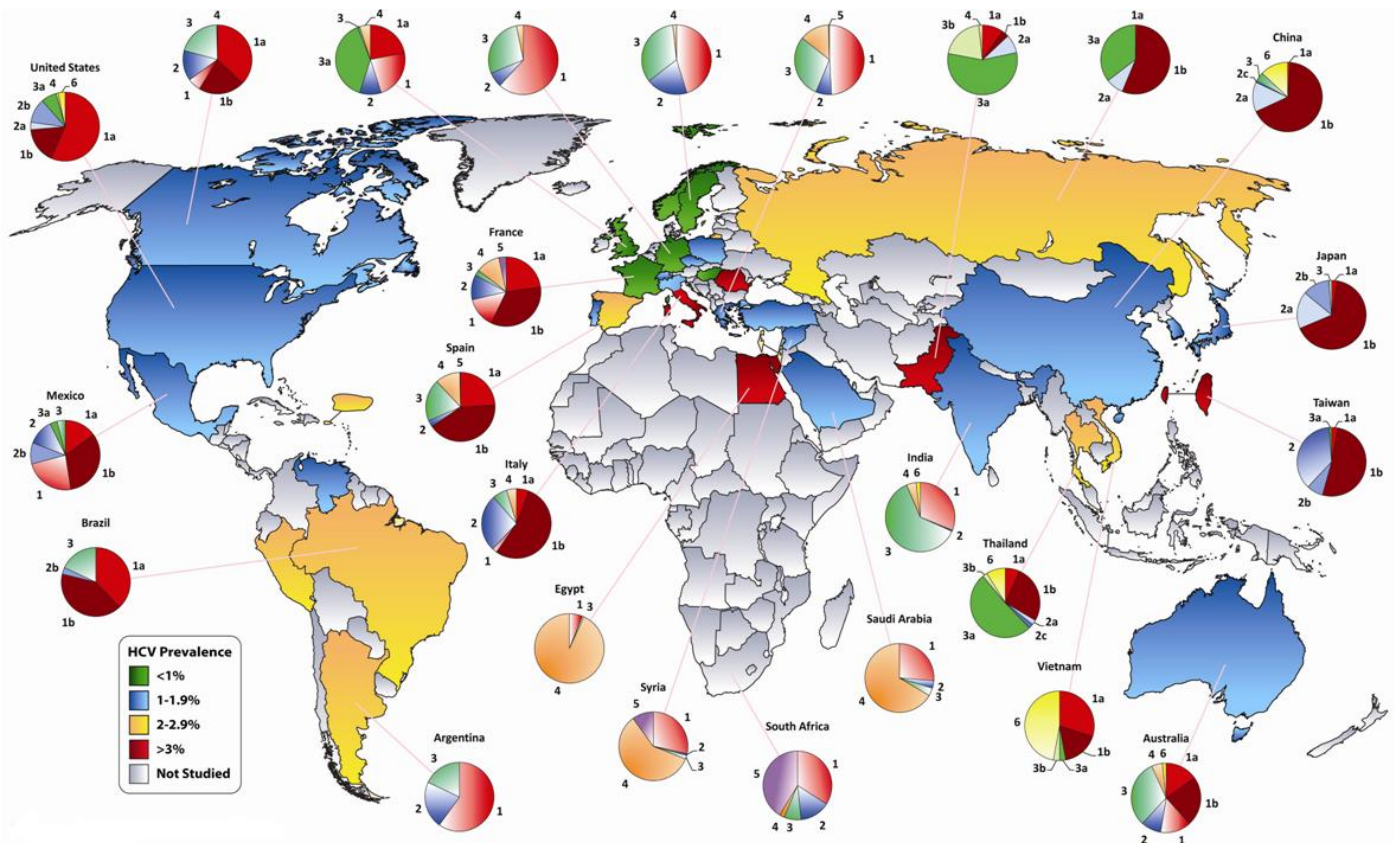


Figura 1: Prevalência e distribuição geográfica dos genótipos do HCV (NEGRO; ALBERTI, 2011).

1.2 Patologia e tratamento

Um grande número de portadores de HCV é assintomático e geralmente são diagnosticados após décadas da infecção, resultando em complicações, tais como a cirrose, insuficiência hepática e hepatocarcinoma (HCC). Estes pacientes assintomáticos representam também um reservatório natural da doença e uma fonte de disseminação do HCV (RANTALA; VAN DE LAAR, 2008).

A fase aguda é frequentemente subclínica e a evolução para a cronicidade ocorre em aproximadamente 85% dos casos (ALTER; HOUGHTON, 2000). Na fase crônica 20% dos pacientes desenvolvem lesões leves no fígado, nos restantes, em até 10 anos os quadros evoluem para fibrose grave e/ou cirrose e entre 30 e 50% dos pacientes com cirrose o quadro clínico pode evoluir para o HCC (GIANNINI; BRECHOT, 2003). Raramente o HCV pode causar um quadro de hepatite fulminante (KATO et al., 2003).

O vírus da hepatite C aumenta o risco de hepatocarcinoma, promovendo inflamação e fibrose do fígado infectado, que eventualmente resulta em cirrose hepática (YAMASHITA; HONDA; KANEKO, 2011). Entretanto, evidências experimentais indicam a contribuição direta do HCV na malignização dos hepatócitos e diferentes proteínas virais

estão sendo relacionadas ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (LEVRERO, 2006). Este potencial está relacionado com a interferência das proteínas do HCV com proteínas celulares que são responsáveis pelo controle do ciclo celular (NGUYEN et al., 2003; SELIMOVIC et al., 2012).

No Brasil o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções (2011) estabelece as condutas para diagnóstico e tratamento dos pacientes. O exame sorológico ocorre em testes de triagem quando há suspeita de infecção pelo vírus. São realizados testes de detecção de anticorpo ou testes de detecção combinada de antígeno e anticorpo do HCV, em que o anti-HCV é considerado o principal marcador (SCHEUER, 1991). A positividade para o anti-HCV não define isoladamente a presença de infecção ativa e deve ser interpretada como contato prévio com o vírus. O resultado deve ser confirmado por testes moleculares para detecção do RNA do vírus, preferencialmente por PCR quantitativo, a fim de avaliar-se a carga viral do paciente (DESMET et al., 1994).

O exame de genotipagem do HCV utiliza testes moleculares baseados em amplificação do RNA viral, capazes de identificar os diversos genótipos, subtipos e populações mistas do HCV. A caracterização genotípica complementa a avaliação clínico-laboratorial na definição da estratégia de tratamento da hepatite crônica (GERMER et al., 1999; TALWANI et al., 2012). Também são levados em consideração os dados obtidos pela biópsia hepática, que é um procedimento invasivo, mas que na maior parte das situações é essencial para o estadiamento da hepatite crônica e para definição da conduta no tratamento (SCHEUER, 1991).

Em geral, todos os pacientes infectados devem ser encaminhados para o tratamento e se possível devem ser submetidos a uma avaliação cuidadosa dos riscos da terapia em relação aos seus benefícios, quanto ao tempo de administração e as drogas disponíveis (TALWANI et al., 2012). O objetivo da terapia antiviral é atingir a resposta virológica sustentada. Isso ocorre quando os níveis de RNA do HCV permanecem indetectáveis por um período mínimo de seis meses após o término da administração das drogas (DHUMEAUX; MARCELLIN; LEREBOURS, 2003).

O tratamento vigente no Brasil, estipulado pelo Ministério da Saúde (2011) para pacientes cronicamente infectados, é a combinação de interferon (INF) alfa (podendo ser peguilado ou não) e ribavirina (RBV). O INF alfa é uma citocina que compõe a resposta inata do hospedeiro; a adição de uma molécula de polietilenoglicol à molécula do IFN alfa (peg-IFN α) prolonga a ação, eleva a velocidade de absorção e aumenta a meia-vida do INF. A RBV é um antiviral análogo de nucleosídeo utilizado por via oral. A ribavirina sempre deve

ser associada ao IFN convencional ou PEG-IFN, pois a monoterapia com RBV não confere ação antiviral no tratamento da hepatite C. O esquema recomendado para tratamento dos pacientes portadores de hepatite C crônica, genótipo 1, é a associação de PEG-IFN e RBV durante 48 a 72 semanas (Figura 2) (FARNIK et al., 2010).

O mesmo tratamento é adotado para pacientes portadores do genótipo 2 ou 3 que possuam fatores preditivos de baixa resposta virológica (como manifestações clínicas de cirrose ou elevada carga viral). Para os pacientes em que estes fatores estejam ausentes é recomendada a associação de IFN convencional e RBV durante 24 semanas (BRASIL, 2011).

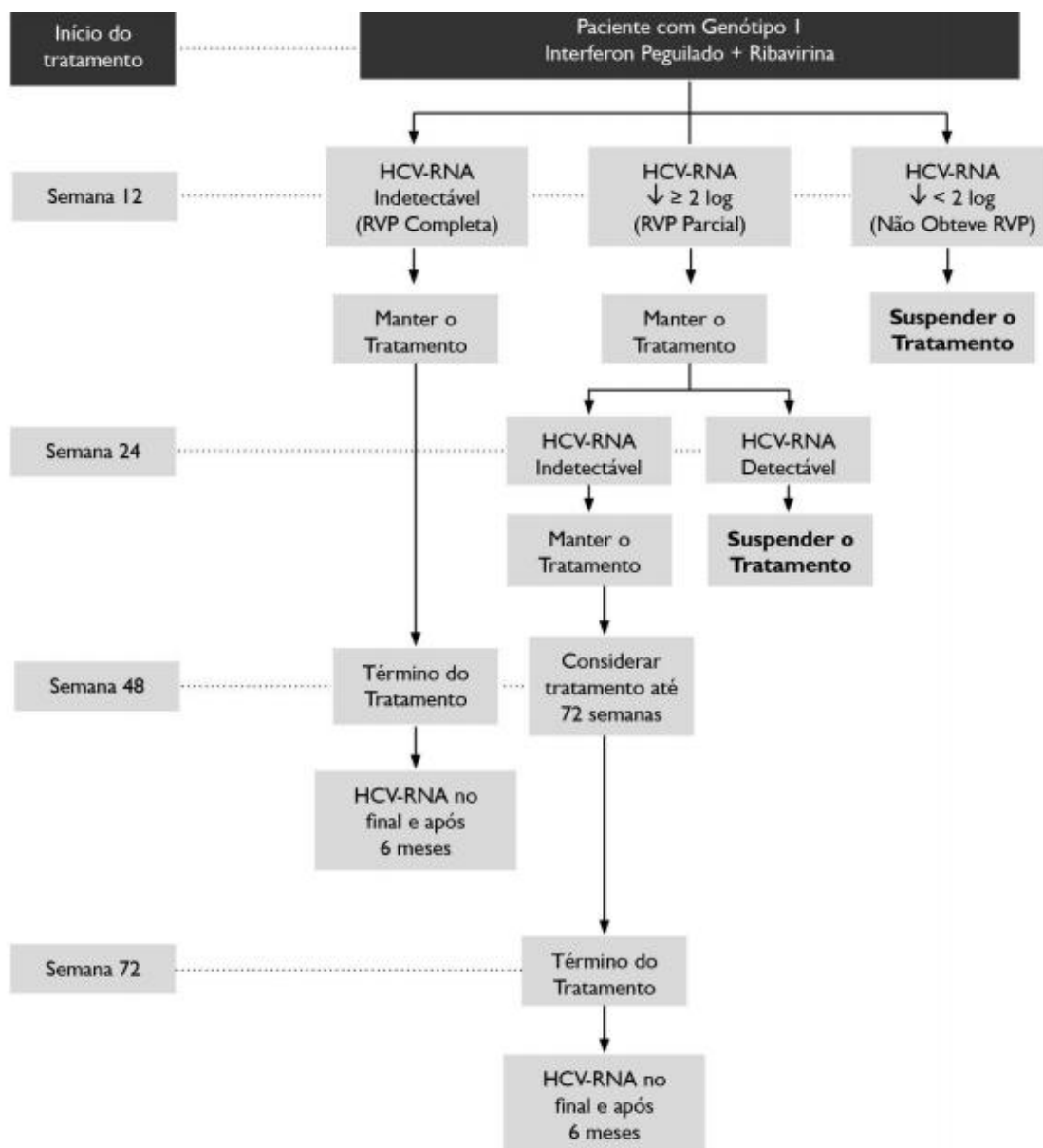


Figura 2: Esquema do tratamento da hepatite C para pacientes portadores do genótipo 1. Resposta virológica precoce (RVP) é definida como a queda de pelo menos duas escalas logarítmicas (2 Log) do valor do RNA HCV em relação ao pré-tratamento (RVP parcial), ou sua indetecção na 12ª semana de tratamento (RVP total) (BRASIL, 2011).

Entretanto o tratamento vigente no combate à hepatite C apresenta uma resposta virológica sustentada de apenas 50-60% nos casos de infecção pelo genótipo 1 e de 70-80% para pacientes com infecção pelo genótipo 2 ou 3 (BARTENSCHLAGER; SPARACIO, 2007). As terapias atuais, além de apresentarem um elevado custo, causam uma série de efeitos colaterais incluindo irritabilidade, dor de cabeça, sintomas semelhantes à gripe, anemia, depressão e sintomas gastrointestinais (FRIED et al., 2002; CHOU et al., 2013).

Nos últimos anos, ensaios clínicos utilizando agentes antivirais de ação direta contra o HCV, têm mostrado que os inibidores de protease (IP) são uma estratégia eficaz para o tratamento do genótipo 1. Boceprevir e Telaprevir são os primeiros IP para tratamento do HCV e foram recentemente registrados na ANVISA, permitindo sua introdução no arsenal terapêutico nacional. Essas duas medicações apresentam moléculas diferentes e atuam inibindo a enzima serino-protease NS3 do HCV, agindo diretamente sobre o vírus da Hepatite C através do bloqueio da sua replicação. Ambos são utilizados em associação com INF e RBV, constituindo assim uma terapia tripla (ESTEBAN; BUTI, 2012)

Entretanto assim como no tratamento clássico, os novos fármacos podem trazer diversos efeitos colaterais. A utilização do Boceprevir pode desencadear neutropenia, anemia, e trombocitopenia e a utilização do Telaprevir está relacionada a quadros de anemia. Outros efeitos colaterais podem ser observados como prurido maculopapular e erupção cutânea anal na utilização do Telaprevir e disgeusia no caso do Boceprevir (TALWANI et al., 2012). Em todas as terapias antivirais as taxas de resposta ao tratamento são mais baixas em pacientes idosos, negros, portadores do genótipo 1, fibrose avançada ou pacientes com maior carga viral (CHOU et al., 2013).

1.3 Vírus da hepatite C

O HCV é um vírus da família *Flaviviridae*, pertencente ao gênero *Hepacivirus*. A partícula viral, com aproximadamente 50 nm, é formada por um envelope viral derivado das membranas do hospedeiro, onde estão inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2. O capsídeo proteico é formado por proteínas do core e pelo material genético do vírus (Figura 3) (KAITO et al., 1994).

O genoma de 9.6kb é constituído por uma fita simples de RNA, polaridade positiva, com uma única região aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) (FERREIRA et al., 2004). O RNA viral codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.000 aminoácidos que posteriormente é clivada por proteases celulares e virais originando proteínas estruturais (Core, E1, E2 e p7) e proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). Nas extremidades do genoma estão localizadas regiões conservadas e não traduzidas 5' e 3' (*untranslated region* - UTR) (MORADPOUR et al., 2001; BARTENSCHLAGER; FRESE; PIETSCHMANN, 2004) necessárias tanto para a tradução da proteína quanto para a replicação do vírus (Figura 4) (FRIEBE; BARTENSCHLAGER, 2002).

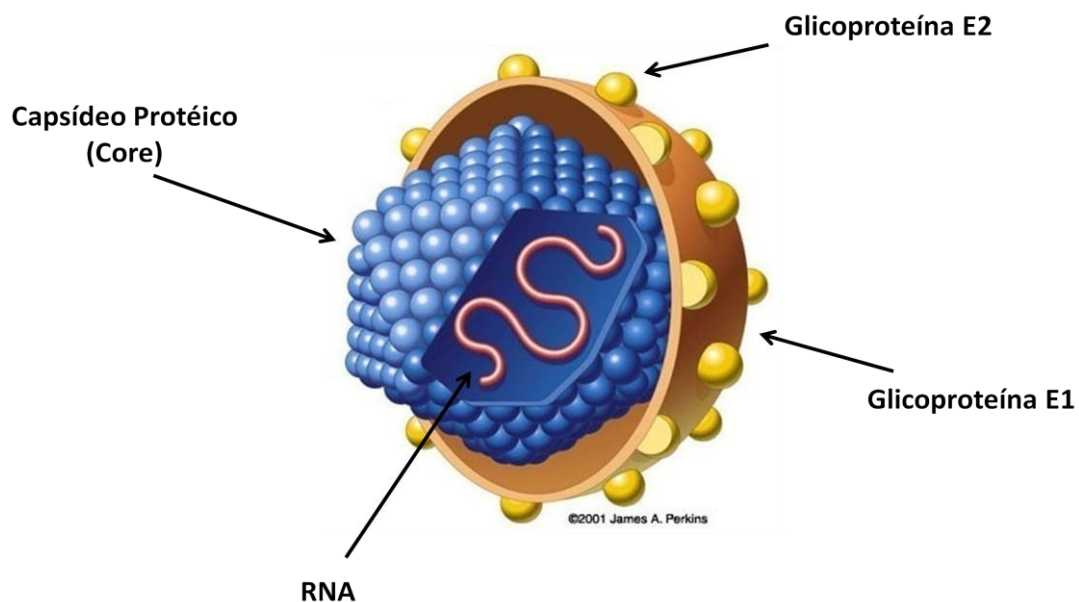
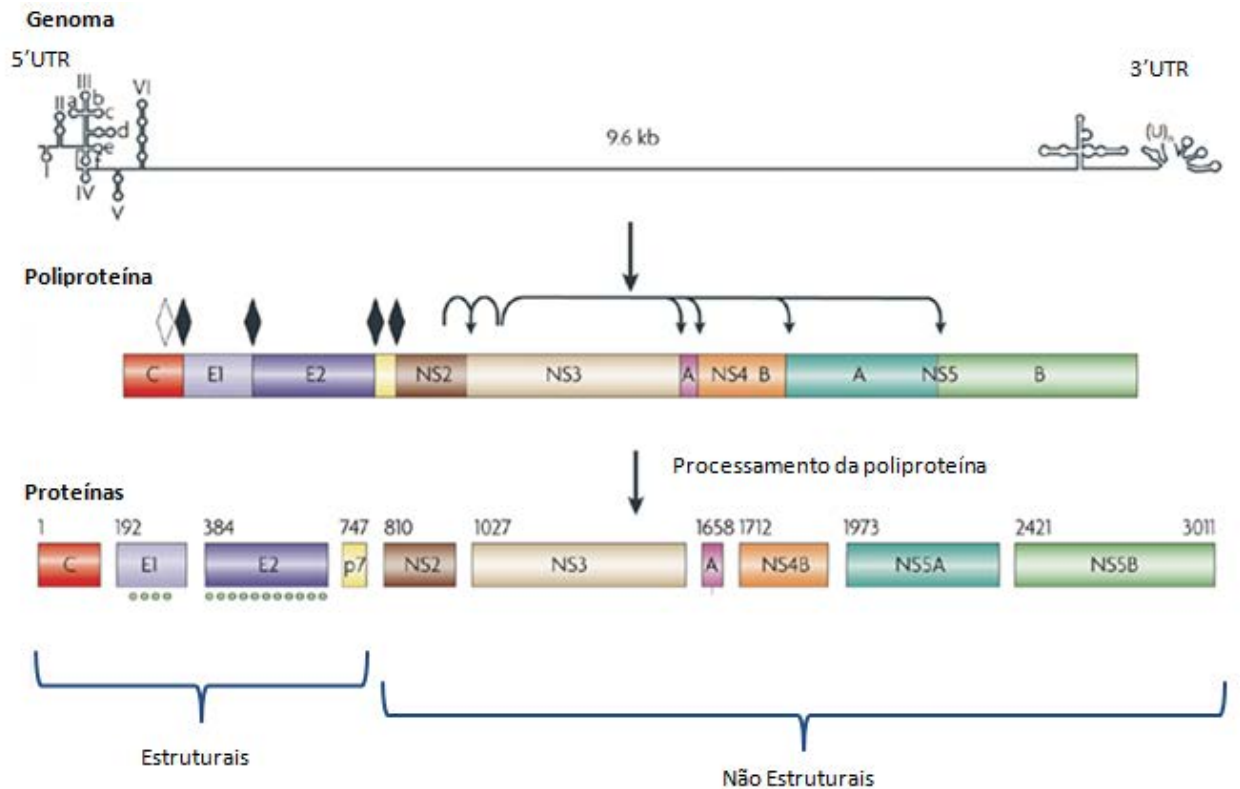


Figura 3: Morfologia do vírus da Hepatite C. Fonte: adaptado de James, 2001.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 4: Estrutura genômica e proteômica do HCV. Fonte: Adaptado de MORADPOUR; PENIN; RICE (2007).

A região não traduzida na extremidade 5' (5'UTR) é constituída por quatro domínios de RNA altamente conservados e um sítio de entrada ribossomal conhecido como IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*). A IRES desempenha um papel importante na replicação do vírus, sendo essencial na tradução da poliproteína viral (LINDENBACH; RICE, 2005). A região 5'UTR do HCV, com 341 nucleotídeos na maioria dos isolados virais, possui estrutura secundária complexa e que apresenta alto grau de conservação entre os diferentes isolados, apresentando geralmente mais de 90% de similaridade entre as diferentes seqüências (BUKH; PURCELL; MILLER, 1992).

A região 3'UTR é formada por um sítio variável de aproximadamente 40 nucleotídeos, seguido de uma região poli U (polipirimidina), e uma região conservada de 98 nucleotídeos (LINDENBACH; RICE, 2005).

A proteína do core, composta pelos primeiros 191 aminoácidos, é a segunda região mais conservada do genoma viral e constitui o seu nucleocapsídeo. Geralmente é encontrada no citoplasma, onde está ligada ao retículo endoplasmático, ou pode estar localizada no núcleo em menor proporção. Além disso, a proteína do core pode estar envolvida na modulação da transcrição de genes, proliferação celular, apoptose e sinalização

celular, podendo interferir no metabolismo de lipídeos e na supressão da resposta imune (GIANNINI; BRECHOT, 2003; PENIN et al., 2004).

As proteínas do envelope (E1 e E2) possuem regiões muito variáveis e estão altamente glicosiladas. Apresentam um importante papel na entrada do vírus na célula devido à ligação destas proteínas com receptores celulares, como o CD81 e SR-B1 (SCARSELLI et al., 2002). O peptídeo p7, com 63 aminoácidos, possui atividade de canal iônico, similar ao grupo proteico das viroporinas (STEINMANN et al., 2007).

A primeira proteína não estrutural é a proteína NS2, apresentando 217 aminoácidos. Essa proteína aparece associada com a NS3, formando a autoprotease NS2/NS3, e é responsável pela maturação das outras proteínas NS e pela clivagem da junção NS2/NS3 (LINDENBACH; RICE, 2005). Estudos demonstram que a protease NS2/NS3 pode ser dispensável para replicação do RNA incompleto do HCV *in vitro*, mas é essencial para o ciclo de replicação completa, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KOLYKHALOV et al., 2000; PIETSCHMANN et al., 2006).

A NS3 é uma proteína multifuncional constituída de um domínio N-terminal serino protease e um domínio C-terminal RNA helicase/NTPase. A serino protease e o cofator NS4A estabilizam e ativam a função protease para clivar os sítios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (LINDENBACH; RICE, 2005).

O polipeptídeo NS4A funciona como um co-fator para a proteína NS3, formando um complexo NS3/NS4A. Outra função atribuída a esta proteína é a participação na hiperfosforilação da NS5A (MACDONALD; HARRIS, 2004).

As funções da proteína NS4B ainda não foram muito bem caracterizadas. Trata-se de uma pequena proteína hidrofóbica que participa de um importante papel no recrutamento de outras proteínas virais. A NS4B interage diretamente com a proteína NS4A e indiretamente com NS3 e NS5A (LIN et al., 1997). Estudos demonstraram que a NS4B está envolvida na produção de uma estrutura de membrana citoplasmática (“*membranous web*”) que forma o complexo de replicação viral (EGGER et al., 2002).

A proteína não estrutural NS5A é uma fosfoproteína ancorada na membrana do retículo endoplasmático que possui várias funções na replicação viral, resistência ao interferon e patogênese (REED; XU; RICE, 1997; MACDONALD; HARRIS, 2004). Análises bioquímicas e genéticas das interações proteína-proteína demonstraram que a NS5A é capaz de interagir independentemente com todas as proteínas não-estruturais, incluindo a interação NS5A-NS5A. Estes dados em concordância com a necessidade da presença de outra

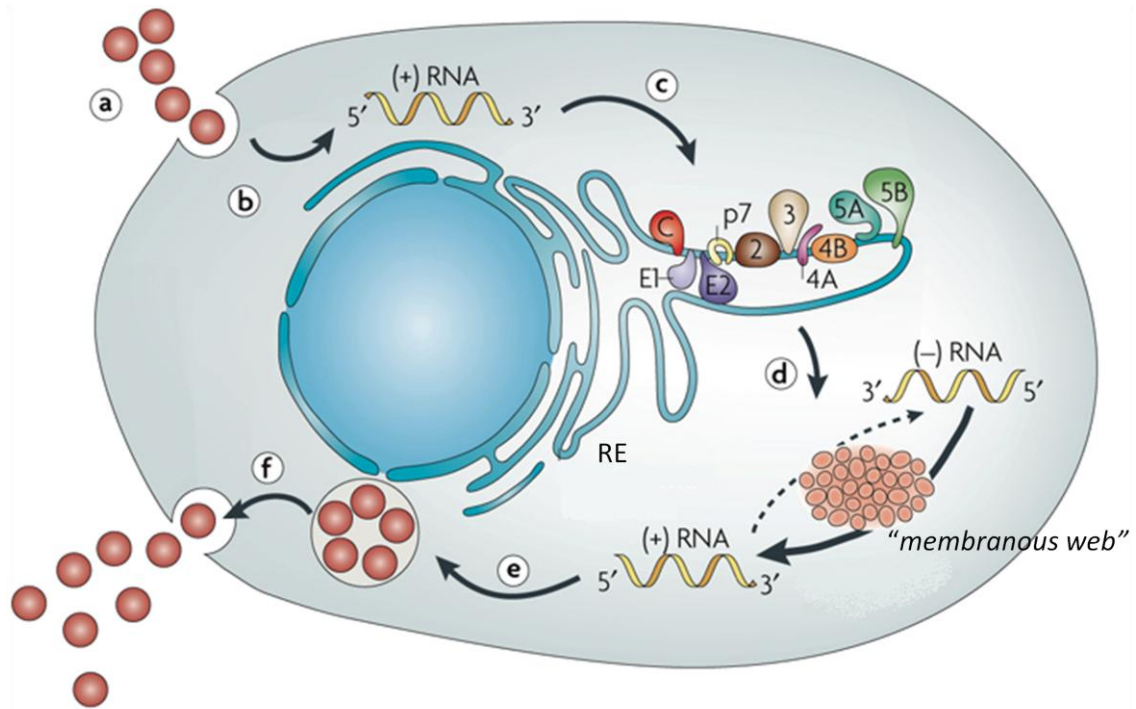
proteína não estrutural para a realização da hiperfosforilação da NS5A indicam a participação desta proteína no complexo de replicação multiprotéico (DIMITROVA et al., 2003).

A proteína NS5B é essencial para a replicação do HCV, pois é responsável pela replicação do material genético do vírus que dará origem aos novos vírions e tem sido considerada um importante alvo para a terapia antiviral (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

A estratégia de replicação do HCV é parecida com a de outros vírus de RNA de polaridade positiva. O ciclo de replicação se inicia com a entrada do vírus em sua célula alvo principal, o hepatócito. A entrada do vírus é um processo altamente complexo e com diversas etapas iniciando-se pela ligação das glicoproteínas do envelope E1 e E2 com diferentes proteínas/receptores presentes na superfície da célula (por exemplo, heparam sulfato e receptores de proteínas de baixa densidade) ou ainda que contribuem para a entrada do vírus (CD81, ocludina, claudina) (ZEISEL et al., 2011; BUHLER; BARTENSCHLAGER, 2012).

Após a entrada do vírus na célula e liberação do material genético, o RNA viral é traduzido a partir da IRES, localizada na região 5'UTR. A tradução gera uma poliproteína que é clivada por proteases virais e do hospedeiro em pelo menos 10 proteínas diferentes. O primeiro terço do genoma codifica proteínas que compõem a partícula do vírus; core, E1, E2 e p7, que são necessárias para a montagem e liberação de partículas infecciosas. As proteínas do core associam-se às demais proteínas estruturais, integram-se com a membrana do retículo endoplasmático (RE) formando oligômeros funcionais e assim promovem a montagem da nova partícula viral (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

O restante do genoma codifica as proteínas não estruturais (NS) que são responsáveis pelo processo de replicação do HCV. Estas proteínas se associam do lado citoplasmático da membrana do RE onde interagem entre si e com as proteínas hospedeiras para formar o complexo replicativo do vírus. Essa maquinaria usa seu próprio genoma como molde para transcrição de fita complementar negativa de RNA. Essa fita negativa ou dupla fita, por sua vez, serve como uma molécula replicativa intermediária na síntese de uma nova molécula de RNA de polaridade positiva que pode ser usada para tradução, replicação ou então ser empacotada para constituir novos vírions (Figura 5) (DE FRANCESCO et al., 2003; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 5: Ciclo de replicação do HCV. (a) Internalização do vírus na célula. (b) Liberação citoplasmática. (c) Tradução e processamento da poliproteína. (d) Replicação do RNA viral. (e) Montagem da partícula viral. (f) Maturação e liberação dos vírions. Fonte: adaptado de MORADPOUR; PENIN; RICE (2007).

1.4 RNA de interferência

Devido à eficiência relativamente baixa dos fármacos tradicionais utilizados no manejo da infecção crônica pelo HCV, novas ferramentas têm sido estudadas na busca por tratamentos mais eficazes contra a hepatite C. Uma dessas novas metodologias é baseada no silenciamento gênico pós-transcricional por meio da utilização do RNA de interferência (RNAi). A função de silenciamento gênico pela via de RNAi foi originalmente descrita por FIRE et al. (1998) em *Caenorhabditis elegans* como uma resposta biológica à introdução de sequências de RNA de dupla fita (dsRNA) que induzem o silenciamento pós-transcricional gene específico (BAULCOMBE, 1999).

A interferência mediada por RNA é um fenômeno que naturalmente ocorre em organismos eucariotos e parece exercer primordialmente um papel na eliminação de RNAs mensageiros anômalos, proporcionando a defesa do organismo hospedeiro contra parasitas intracelulares, a exemplo dos vírus (BAULCOMBE, 1999; TABARA et al., 1999). Existem

evidências também de que o RNAi desempenhe um importante papel na regulação da expressão de genes celulares (SZWEYKOWSKA-KULINSKA; JARMOLOWSKI; FIGLEROWICZ, 2003).

No processo de silenciamento, uma fita dupla de RNA (*double-stranded* - dsRNA) é clivada por uma ribonuclease do tipo III (Dicer) em curtos fragmentos com 19 a 22 nucleotídeos, denominados *short interfering RNA* (siRNA). Estes são incorporados em um complexo de silenciamento (RISC) induzido pelo RNA onde a fita *sense* é removida por uma helicase e, por fim, o conjunto RISC e a fita *antisense* atuam sobre seu alvo de mRNA homólogo para a clivagem endonucleolítica (Figura 6) (HAMMOND et al., 2000; COLLINS; CHENG, 2006; MORRIS; ROSSI, 2006).

RNA de interferência, RNAi

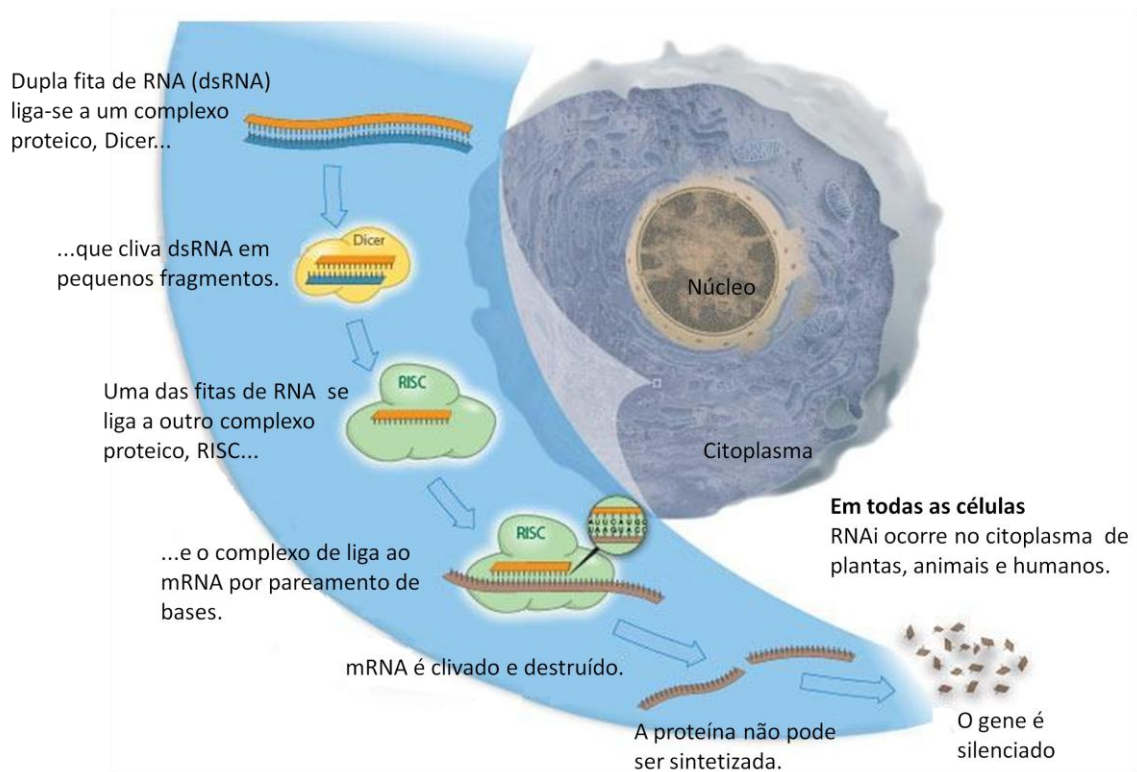


Figura 6: Mecanismo de silenciamento do RNA de interferência. Fonte: adaptado de < www.nobelprize.org >, acessado em 15/07/2013.

Diversos estudos tem proposto o RNAi como uma potencial ferramenta para o tratamento de infecções virais *in vivo*, como nos casos do vírus influenza (TOMPKINS et al., 2004), vírus respiratório sincicial (RSV)(BITKO et al., 2005), coronavírus associado com SARS (ZHENG et al., 2004) e herpes simplex vírus (HSV-2) (CRISTOFARO;

RAMRATNAM, 2006), usando aplicações tópicas destas moléculas (MOTAVAF; SAFARI; ALAVIAN, 2012).

Alguns trabalhos *in vitro* utilizando sequências de siRNA voltadas para o genoma do HCV já foram publicados, a maioria demonstrando uma expressiva atividade inibitória da ação do vírus (WATANABE; UMEHARA; KOHARA, 2007). Uma dificuldade encontrada pelos pesquisadores é a elevada taxa de mutação do vírus e algumas variantes virais são capazes de escapar dos efeitos do RNAi (GITLIN; KARELSKY; ANDINO, 2002). Para reduzir essa evasão viral têm-se utilizado a combinação de diferentes moléculas de siRNA, pois estas podem ser mais eficientes em reduzir a probabilidade de simultâneas mutações em múltiplos sítios (KONISHI et al., 2006).

Outra abordagem adotada para reduzir a evasão viral é a utilização de moléculas de RNAi direcionadas para genes celulares importantes na replicação viral, já que as taxas de mutação do hospedeiro são menores que as virais. Estes genes alvos codificam proteínas que são essenciais na replicação do vírus e quando inibidas podem bloquear a replicação viral (KHALIQ et al., 2010). Com isso, combinar siRNA direcionados para regiões virais ou proteínas do hospedeiro pode ser uma ferramenta efetiva no bloqueio da infecção e replicação do HCV (SAMREEN et al., 2012).

As aplicações do RNAi podem ser mediadas por meio de dois tipos de moléculas: uma sintetizada quimicamente denominada *short interfering RNA* (siRNA) ou uma molécula baseada em um vetor expressando *short hairpin RNA* (shRNA), que pode ser um plasmídeo ou um vetor viral (Figura 7) (MIYAGISHI; TAIRA, 2002; YU; DERUITER; TURNER, 2002). Ambas as técnicas de RNAi oferecem vantagens e sofrem de limitações. Por exemplo, o uso de siRNA teoricamente permite a entrega de uma quantidade controlada destas moléculas efetoras nas células. Entretanto uma desvantagem provem do fato da molécula de siRNA apresentar um efeito transitório e portanto seria necessária a administração frequente da mesma em um ambiente terapêutico (ROMANO; MCCALLUS; PACHUK, 2006).

A produção intracelular de siRNA pode ser obtida por meio de plasmídeos ou vetores virais que contêm unidades de expressão de shRNA (ROMANO; MCCALLUS; PACHUK, 2006). Sistemas adenovirais e lentivirais foram usados com sucesso para fornecer shRNA em linhagens celulares primárias, incluindo linfócitos, hepatócitos e neurônios (COBURN; CULLEN, 2002). Diversos trabalhos tem relatado o uso de siRNA e/ou shRNA para inibir a replicação do HCV em modelos de replicons (RADHAKRISHNAN; LAYDEN; GARTEL, 2004; WATANABE; UMEHARA; KOHARA, 2007), entretanto, em símios as

moléculas de shRNA demonstraram efeitos citotóxicos em altas concentrações (SUHY et al., 2012).

Embora siRNA e shRNA possam ser aplicados para alcançar resultados funcionais semelhantes, tratam-se de moléculas intrinsecamente diferentes, portanto, os mecanismos moleculares de ação, as vias de interferência do RNA, os efeitos fora do alvo e as aplicações também podem ser diferentes (RAO et al., 2009).

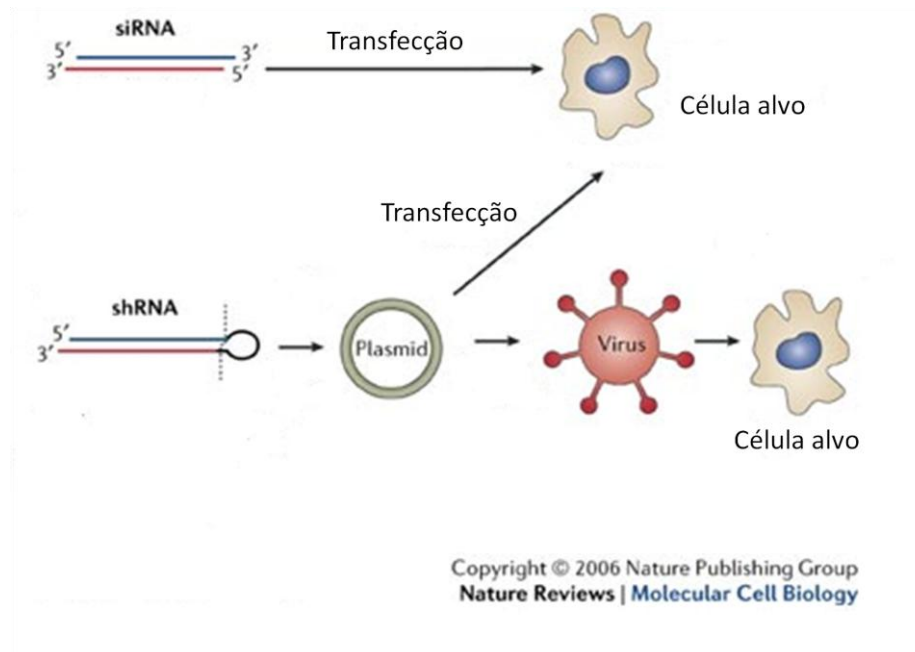


Figura 7: Diferentes formas de entrega de moléculas de siRNA e shRNA dentro das células e seus mecanismos de ação. Fonte: Adaptado MOTAVAF; SAFARI; ALAVIAN (2012)

1.5 Proteínas de choque térmico

Diversas proteínas celulares são conhecidas por interagir com o HCV ou por serem necessárias ao processo de replicação viral. Uma família importante de genes candidatos é a família das *heat shock proteins (Hsps)*, ou proteínas de choque térmico, que geralmente são sintetizadas em resposta ao estresse celular, mas que também podem ser expressas constitutivamente em alguns casos. Existem diversos tipos de estresses que incluem choque térmico, variação do pH, toxicidade a metais, privação de nutrientes, bem como diversos estados patológicos como o câncer e infecções bacterianas ou virais (GETHING, 1996). Em condições normais sua função é auxiliar no dobramento e manutenção de diversas proteínas celulares (PANARETOU et al., 1998).

A Hsp90 é uma das proteínas mais abundantes da célula dentro da classe das chaperonas – representando 1-2% das proteínas celulares quando a célula não se encontra sob estresses e 6% sob estresse celular. Em células de mamíferos existem duas isoformas da Hsp90; Hsp90 α e Hsp90 β , que são codificadas por genes diferentes, porém ambas as formas são fortemente relacionadas e parecem ter atividades idênticas, no entanto, a primeira é induzida e a segunda é expressa constitutivamente (CHEN et al., 2005). Hsp90 normalmente atua em associação com outras proteínas co-chaperonas que juntas desempenham um importante papel no dobramento durante a síntese de proteínas, estabilização e redobramento de proteínas desnaturadas em células sob estresse (PICARD, 2002; WEGELE; MULLER; BUCHNER, 2004).

A expressão desta chaperona também pode ser induzida em muitos tipos de tumores e inibidores de Hsp90 tem demonstrado uma promissora classe de fármacos na terapia anti-câncer (UJINO et al., 2009). Os estudos iniciais demonstraram que a Hsp90 é fortemente expressa no carcinoma hepatocelular humano, tanto em linhagens celulares quanto em amostras clínicas (LUK et al., 2006; CALVISI; PASCALE; FEO, 2007).

Esse aumento da expressão das chaperonas em diversos tipos de câncer ocorre em resposta ao estresse proveniente das condições peri-tumorais como a acidose, a hipóxia e a privação de nutrientes (BAGATELL; WHITESELL, 2004). Interações das proteínas Hsp90 com suas proteínas clientes que regulam os mecanismos de apoptose e proliferação levam ao crescimento das células tumorais (TAKAYAMA; REED; HOMMA, 2003). Diversos inibidores de Hsp90, derivados de geldanamicina (GA), estão em triagens clínicas para o câncer e alguns destes inibidores tem apresentado uma promissora, mas ainda limitada, ação clínica (BANERJI et al., 2005; SHARP; WORKMAN, 2006). A geldanamicina é conhecida por se ligar ao sítio ATP/ADP da proteína Hsp90 e inibir sua atividade enzimática, resultando em uma degradação das proteínas clientes desta chaperona (NECKERS, 2002).

A proteína Hsp90 é um fator do hospedeiro importante na regulação da replicação do HCV (NAKAGAWA et al., 2007). Ela apresenta uma interação física com a protease viral NS2/3 (WAXMAN et al., 2001), que é responsável pela clivagem entre as proteínas NS2 e NS3 do HCV (GRAKOUÏ et al., 1993; SELBY et al., 1993). OKAMOTO et al. (2006) demonstraram que a proteína FKBP8 forma um complexo com Hsp90 e NS5A, e que este complexo é essencial para a replicação do vírus.

Além desta, outras chaperonas também interagem com proteínas do HCV, como a *heat shock protein 27* (Hsp27) (CHOI et al., 2004). A função dessa proteína do hospedeiro é contribuir para a estabilização intracelular dos filamentos de actina e participar

de um papel regulatório na organização do citoesqueleto (HINO et al., 2000), além de possuir atividade antiapoptótica (WELSH; GAESTEL, 1998).

Essa proteína pertence a uma família de moléculas estruturalmente menores e sua maior expressão confere proteção contra uma variedade de agentes que podem induzir a apoptose, mas também são encontradas em diversos tipos de câncer (CONCANNON; GORMAN; SAMALI, 2003).

Em análises proteômicas de tecidos de hepatocarcinoma foi observado um aumento da expressão de Hsp27 na região tumoral em comparação aos tecidos adjacentes ao tumor (LUK et al., 2006). Estudos também observaram um aumento da expressão de Hsp27 no soro de pacientes com HCC, com relação aos pacientes controle, sugerindo que esta proteína poderia ser um biomarcador para o diagnóstico de HCC (GRUDEN et al., 2013).

Outros estudos também observaram uma maior expressão de Hsp27 em células Huh7 contendo um replicon subgenômico do HCV em relação a células Huh7 sem replicon (FANG et al., 2006). Em pacientes com carcinoma hepatocelular, a alta expressão de Hsp27 está associada com a presença de HCV, porém essa relação não é tão evidente em pacientes com hepatite B (HBV) (HARIMOTO et al., 2004).

Sua relação com o HCV foi demonstrada por Choi e colaboradores em 2004, onde foi observada uma interação física entre a proteína Hsp27 e a proteína viral NS5A (CHOI et al., 2004). Com isso, essa chaperona pode se tornar um potencial alvo de terapias antivirais.

1.6 Estudos *in vitro* da hepatite C

O vírus da hepatite C apresenta um forte tropismo, tanto em termos de espécies nas quais consegue se replicar quanto em tipos celulares. Somente os seres humanos e chimpanzés são naturalmente passíveis de infecção e a principal célula alvo é o hepatócito. Locais extra-hepáticos como linfócitos B e células endoteliais da barreira hematoencefálica podem permitir a entrada do vírus, mas não são capazes de sustentar uma infecção produtiva (MORSICA et al., 1999; FLETCHER et al., 2012).

Desde a identificação do vírus da hepatite C em 1989, a ausência de um sistema de cultura de células confiável para estes vírus vinha dificultando a pesquisa com este importante patógeno humano (DUVERLIE; WYCHOWSKI, 2007). Os estudos sobre o

mecanismo de entrada e replicação do HCV nas células eram limitados devido à ausência de um modelo animal suscetível à infecção e de um sistema celular capaz de suportar o ciclo de replicação viral, produzindo novas partículas. Diversos modelos substitutos foram considerados para o estudo destes mecanismos antes do desenvolvimento de um sistema eficaz em reproduzir todas as etapas de replicação do vírus (SAMREEN et al., 2012).

Estudos *in vitro* para a replicação do HCV são realizados predominantemente na linhagem celular de hepatoma humano Huh7, ou suas derivações Huh7.5 e Huh 7.5.1 (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002; ZHONG et al., 2005). A cultura celular Huh7 é uma linhagem derivada de carcinoma celular que foi originalmente retirado de um tumor no fígado de um paciente japonês em 1982. Outro estudo realizado por SAINZ; BARRETTO; UPRICHARD (2009) demonstraram que apesar das linhagens de células Huh7 variarem em morfologia e crescimento, a maioria é permissiva para a infecção pelo HCV.

Um grande avanço para os estudos foi o desenvolvimento de um sistema de replicação *in vitro* com a construção de replicons capazes de se auto-replicar em culturas de células de hepatoma humano (Huh-7) (IRO et al., 2009). Os replicons para o HCV podem ser subgenômicos (contendo apenas as proteínas não estruturais para a replicação do RNA) ou genômicos (contendo o genoma completo do HCV). Ambos podem conter o gene neomicina fosfotransferase para seleção ao antibiótico G418. Devido à sua elevada eficiência, os replicons tornaram-se aceitos como uma importante ferramenta para estudar os mecanismos moleculares da replicação do vírus da hepatite C. Este sistema promoveu a primeira plataforma baseada em células para rastreamento de possíveis agentes antivirais no combate ao vírus (ALI ASHFAQ et al., 2011; BUHLER; BARTENSCHLAGER, 2012).

Wakita e colaboradores desenvolveram um replicon genômico do HCV (JFH1), expressando o genoma completo do vírus, genótipo 2a, que foi isolado de um paciente japonês com hepatite C fulminante. Este genoma replica eficientemente e produz partículas virais em células Huh7 (WAKITA et al., 2005; ALI ASHFAQ et al., 2011).

Baseando-se na sequência do JFH1, KATO et al. (2003) desenvolveram um replicon subgenômico (pSGR-JFH1), também para o genótipo 2a do HCV. Este replicon subgenômico é composto sequencialmente por um sítio de restrição à enzima EcoRI, o promotor T7, a região não traduzida 5'UTR do HCV, o gene *neo^r* que confere resistência ao antibiótico G418, o sítio de entrada ribossomal de encefalomiocardite IRES EMCV, o fragmento do JFH-1 composto pela maioria das proteínas não estruturais NS3-NS5 e a região 3'UTR do HCV, além da enzima de restrição XbaI (Figura 8).

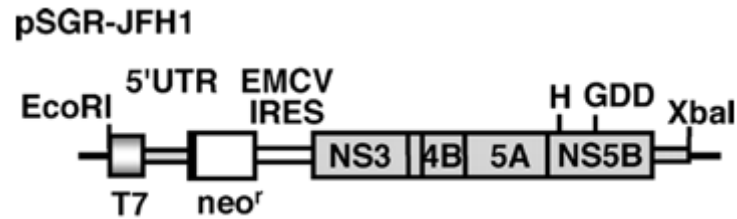


Figura 8: Estrutura do replicon subgenômico pSGR-JFH1. Fonte: KATO et al. (2003).

Com isso, os modelos *in vitro* de replicons sugenômicos do HCV oferecem uma importante ferramenta nos estudos da hepatite C, principalmente no âmbito das terapias que visam suprimir a replicação com agentes antivirais. Neste âmbito, a via do RNA de interferência tem se mostrado uma potente alternativa na terapia antiviral devido à sua alta eficiência e especificidade de silenciamento. Tanto as abordagens de supressão direta do HCV quanto a inibição de proteínas celulares importantes na replicação viral têm sido adotadas, e a combinação destas duas estratégias terapêuticas podem apresentar sucesso no tratamento da hepatite C.

2 JUSTIFICATIVA

A hepatite C pode levar à cirrose e ao hepatocarcinoma, sendo uma das principais responsáveis pela necessidade de transplantes de fígado no mundo. O tratamento atual é feito com interferon e ribavirina, porém a resposta virológica sustentada é de apenas 40% para portadores do genótipo 1, o mais prevalente no Brasil. Esse quadro demonstra a urgente necessidade de terapias mais eficientes contra o HCV.

O mecanismo de silenciamento pós transcricional via RNAi tem sido uma alternativa promissora na inibição da replicação viral. Porém devido às altas taxas de mutação do HCV, as moléculas de siRNA podem se tornar ineficazes após um período de tratamento mais prolongado. Uma alternativa para evitar essa evasão viral seria a utilização de um conjunto de siRNAs e o direcionamento destas moléculas para regiões mais conservadas do genoma do vírus. Outra alternativa recentemente abordada é a inibição de proteínas do hospedeiro que participam do ciclo de replicação viral.

Uma classe de proteínas candidatas a essa nova estratégia no combate à replicação viral é a classe das proteínas de choque térmico (*heat shock proteins – Hsp*). Já foi demonstrada a participação de algumas Hsps no processo de replicação do HCV. As proteínas Hsp90 e Hsp27 interagem com a proteína viral NS5A, enquanto a Hsp90 interage também com a proteína NS3. A utilização de moléculas de siRNA direcionadas para silenciar Hsps participantes do processo de replicação do HCV somada à moléculas silenciadoras de genes virais tornam a busca pelo desenvolvimento de drogas para o tratamento da hepatite C mais consistentes, podendo tornar a inibição viral mais eficiente e com uma melhor resposta virológica sustentada. Tal abordagem pode futuramente se tornar uma nova alternativa terapêutica no tratamento da hepatite C.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Reduzir a replicação do HCV *in vitro* utilizando-se moléculas de siRNA direcionadas para o genoma viral em combinação com siRNA direcionados para os genes celulares Hsp27 e Hsp90

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do HCV sob influência de quatro moléculas de siRNA direcionadas para as regiões virais 5'UTR, NS3 e NS5A.
- Avaliar a expressão do HCV sob influência de siRNA direcionados para genes celulares Hsp27 e Hsp90.
- Avaliar a expressão do HCV sob influência de duas moléculas de siRNA, uma direcionada para o genoma viral e outra para um gene celular.
- Avaliar os efeitos a longo prazo na expressão do HCV sob influência das moléculas de siRNA, em conjunto e/ou separadamente.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHA, S. et al. Reliability of hepatitis C virus core antigen assay for detection of viremia in HCV genotypes 1, 2, 3, and 4 infected blood donors: a collaborative study between Japan, Egypt, and Uzbekistan. **J Med Virol**, v. 73, n. 2, p. 216-22, Jun 2004.
- ALI ASHFAQ, U. et al. Post-transcriptional inhibition of hepatitis C virus replication through small interference RNA. **Virol J**, v. 8, p. 112, 2011.
- ALTER, H. J.; HOUGHTON, M. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. **Nat Med**, v. 6, n. 10, p. 1082-6, Oct 2000.
- ALTER, M. J. HCV routes of transmission: what goes around comes around. **Semin Liver Dis**, v. 31, n. 4, p. 340-6, Nov 2011.
- ANDRADE, A. F. et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 673-6, Sep 2006.
- BAGATELL, R.; WHITESELL, L. Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 8, p. 1021-30, Aug 2004.
- BANERJI, U. et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 18, p. 4152-61, Jun 20 2005.
- BARTENSCHLAGER, R.; FRESE, M.; PIETSCHMANN, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. **Adv Virus Res**, v. 63, p. 71-180, 2004.
- BARTENSCHLAGER, R.; SPARACIO, S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. **Virus Res**, v. 127, n. 2, p. 195-207, Aug 2007.
- BAULCOMBE, D. C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Curr Opin Plant Biol**, v. 2, n. 2, p. 109-13, Apr 1999.
- BITKO, V. et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. **Nat Med**, v. 11, n. 1, p. 50-5, Jan 2005.
- BLIGHT, K. J.; MCKEATING, J. A.; RICE, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. **J Virol**, v. 76, n. 24, p. 13001-14, Dec 2002.

BUHLER, S.; BARTENSCHLAGER, R. New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C. **Liver Int**, v. 32 Suppl 1, p. 9-16, Feb 2012.

BUKH, J.; PURCELL, R. H.; MILLER, R. H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 11, p. 4942-6, Jun 1 1992.

BUSCH, M. P. et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. **Transfusion**, v. 45, n. 2, p. 254-64, Feb 2005.

BUTT, A. A. Hepatitis C virus infection: the new global epidemic. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 3, n. 2, p. 241-9, Apr 2005.

CALVISI, D. F.; PASCALE, R. M.; FEO, F. Dissection of signal transduction pathways as a tool for the development of targeted therapies of hepatocellular carcinoma. **Rev Recent Clin Trials**, v. 2, n. 3, p. 217-36, Sep 2007.

CHEN, B. et al. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. **Genomics**, v. 86, n. 6, p. 627-37, Dec 2005.

CHOI, Y. W. et al. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 318, n. 2, p. 514-9, May 28 2004.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, Apr 21 1989.

CHOU, R. et al. Comparative effectiveness of antiviral treatment for hepatitis C virus infection in adults: a systematic review. **Ann Intern Med**, v. 158, n. 2, p. 114-23, Jan 15 2013.

COBURN, G. A.; CULLEN, B. R. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. **J Virol**, v. 76, n. 18, p. 9225-31, Sep 2002.

COLLINS, R. E.; CHENG, X. Structural and biochemical advances in mammalian RNAi. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 5, p. 1251-66, Dec 1 2006.

CONCANNON, C. G.; GORMAN, A. M.; SAMALI, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 1, p. 61-70, Jan 2003.

CORNBERG, M. et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. **Liver Int**, v. 31 Suppl 2, p. 30-60, Jul 2011.

CRISTOFARO, P.; RAMRATNAM, B. RNAi tackles a sexually transmitted disease. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 1, p. 48-9, Jan 2006.

DE FRANCESCO, R. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. **Antiviral Res**, v. 58, n. 1, p. 1-16, Mar 2003.

DESMET, V. J. et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 1513-20, Jun 1994.

DHUMEAUX, D.; MARCELLIN, P.; LEREBOURS, E. Treatment of hepatitis C. The 2002 French consensus. **Gut**, v. 52, n. 12, p. 1784-7, Dec 2003.

DI BISCEGLIE, A. M.; HOOFNAGLE, J. H. Optimal therapy of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S121-7, Nov 2002.

DIMITROVA, M. et al. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5401-14, May 2003.

DUVERLIE, G.; WYCHOWSKI, C. Cell culture systems for the hepatitis C virus. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 17, p. 2442-5, May 7 2007.

EGGER, D. et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J Virol**, v. 76, n. 12, p. 5974-84, Jun 2002.

ESTEBAN, R.; BUTI, M. Triple therapy with boceprevir or telaprevir for treatment naive HCV patients. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 26, n. 4, p. 445-53, Aug 2012.

FANG, C. et al. Proteome analysis of human liver carcinoma Huh7 cells harboring hepatitis C virus subgenomic replicon. **Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 519-27, Jan 2006.

FARNIK, H. et al. Meta-analysis shows extended therapy improves response of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 8, n. 10, p. 884-90, Oct 2010.

FERREIRA, C. T. et al. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine in children with Down syndrome. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 39, n. 4, p. 337-40, Oct 2004.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 19 1998.

FLETCHER, N. F. et al. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. **Gastroenterology**, v. 142, n. 3, p. 634-643 e6, Mar 2012.

FRIEBE, P.; BARTENSCHLAGER, R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. **J Virol**, v. 76, n. 11, p. 5326-38, Jun 2002.

FRIED, M. W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v. 347, n. 13, p. 975-82, Sep 26 2002.

GERMER, J. J. et al. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 8, p. 2625-30, Aug 1999.

GETHING, M. J. Molecular chaperones: clasping the prize. **Curr Biol**, v. 6, n. 12, p. 1573-6, Dec 1 1996.

GIANNINI, C.; BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ**, v. 10 Suppl 1, p. S27-38, Jan 2003.

GITLIN, L.; KARELSKY, S.; ANDINO, R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. **Nature**, v. 418, n. 6896, p. 430-4, Jul 25 2002.

GRAKOU, A. et al. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 22, p. 10583-7, Nov 15 1993.

GRUDEN, G. et al. Serum heat shock protein 27 levels in patients with hepatocellular carcinoma. **Cell Stress Chaperones**, v. 18, n. 2, p. 235-41, Mar 2013.

HAMMOND, S. M. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 293-6, Mar 16 2000.

HARIMOTO, N. et al. The role of heat shock protein 27 expression in hepatocellular carcinoma in Japan: special reference to the difference between hepatitis B and C. **Liver Int**, v. 24, n. 4, p. 316-21, Aug 2004.

HINO, M. et al. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 271, n. 1, p. 164-9, Apr 29 2000.

INDOLFI, G.; NESI, A.; RESTI, M. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. **J Med Virol**, v. 85, n. 4, p. 608-14, Apr 2013.

IRO, M. et al. A reporter cell line for rapid and sensitive evaluation of hepatitis C virus infectivity and replication. **Antiviral Res**, v., May 3 2009.

KAITO, M. et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol**, v. 75 (Pt 7), p. 1755-60, Jul 1994.

KATO, T. et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1808-17, Dec 2003.

KHALIQ, S. et al. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 1, p. 27-34, Jan-Feb 2010.

KOLYKHALOV, A. A. et al. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. **J Virol**, v. 74, n. 4, p. 2046-51, Feb 2000.

KONISHI, M. et al. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. **J Viral Hepat**, v. 13, n. 11, p. 756-61, Nov 2006.

KOZIEL, M. J.; PETERS, M. G. Viral hepatitis in HIV infection. **N Engl J Med**, v. 356, n. 14, p. 1445-54, Apr 5 2007.

KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods Mol Biol**, v. 510, p. 33-53, 2009.

LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 107-15, Feb 2011.

LEE, C. M. et al. Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan. **Intervirology**, v. 49, n. 1-2, p. 76-81, 2006.

LEVRERO, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3834-47, Jun 26 2006.

LIN, C. et al. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. **J Virol**, v. 71, n. 9, p. 6465-71, Sep 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933-8, Aug 18 2005.

LUK, J. M. et al. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. **Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 1049-57, Feb 2006.

MACDONALD, A.; HARRIS, M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 9, p. 2485-502, Sep 2004.

MIYAGISHI, M.; TAIRA, K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 5, p. 497-500, May 2002.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 453-63, Jun 2007.

MORADPOUR, D. et al. Hepatitis C: a concise review. **Minerva Med**, v. 92, n. 5, p. 329-39, Oct 2001.

MORRIS, K. V.; ROSSI, J. J. Antiviral applications of RNAi. **Curr Opin Mol Ther**, v. 8, n. 2, p. 115-21, Apr 2006.

MORSICA, G. et al. Replication of hepatitis C virus in B lymphocytes (CD19+). **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1138-9, Aug 1 1999.

MOTAVAF, M.; SAFARI, S.; ALAVIAN, S. M. Therapeutic potential of RNA interference: a new molecular approach to antiviral treatment for hepatitis C. **J Viral Hepat**, v. 19, n. 11, p. 757-65, Nov 2012.

NAKAGAWA, S. et al. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 4, p. 882-8, Feb 23 2007.

NAKANO, T. et al. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. **Liver Int**, v. 32, n. 2, p. 339-45, Feb 2012.

NECKERS, L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 4 Suppl, p. S55-61, 2002.

NEGRO, F.; ALBERTI, A. The global health burden of hepatitis C virus infection. **Liver Int**, v. 31 Suppl 2, p. 1-3, Jul 2011.

NGUYEN, H. et al. Hepatitis C virus core protein expression leads to biphasic regulation of the p21 cdk inhibitor and modulation of hepatocyte cell cycle. **Virology**, v. 312, n. 1, p. 245-53, Jul 20 2003.

OKAMOTO, T. et al. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. **EMBO J**, v. 25, n. 20, p. 5015-25, Oct 18 2006.

PALTANIN, L. F.; REICHE, E. M. [Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 36, n. 4, p. 393-9, Aug 2002.

PANARETOU, B. et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. **EMBO J**, v. 17, n. 16, p. 4829-36, Aug 17 1998.

PAWLITSKY, J. M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. **Clin Liver Dis**, v. 7, n. 1, p. 45-66, Feb 2003.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5-19, Jan 2004.

PERONE, C. et al. [High prevalence of genotype 1 in individuals with hepatitis C in Belo Horizonte, MG]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 3, p. 238-42, May-Jun 2008.

PICARD, D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 10, p. 1640-8, Oct 2002.

PIETSCHMANN, T. et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 19, p. 7408-13, May 9 2006.

RADHAKRISHNAN, S. K.; LAYDEN, T. J.; GARTEL, A. L. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. **Virology**, v. 323, n. 2, p. 173-81, Jun 1 2004.

RANTALA, M.; VAN DE LAAR, M. J. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. **Euro Surveill**, v. 13, n. 21, May 22 2008.

RAO, D. D. et al. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 9, p. 746-59, Jul 25 2009.

REED, K. E.; XU, J.; RICE, C. M. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. **J Virol**, v. 71, n. 10, p. 7187-97, Oct 1997.

ROMANO, P. R.; MCCALLUS, D. E.; PACHUK, C. J. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3857-65, Jun 26 2006.

SAINZ, B., JR.; BARRETTO, N.; UPRICHARD, S. L. Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6561, 2009.

SAMREEN, B. et al. Hepatitis C virus entry: role of host and viral factors. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 8, p. 1699-709, Dec 2012.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 21, n. 19, p. 5017-25, Oct 1 2002.

SCHEUER, P. J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. **J Hepatol**, v. 13, n. 3, p. 372-4, Nov 1991.

SELBY, M. J. et al. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. **J Gen Virol**, v. 74 (Pt 6), p. 1103-13, Jun 1993.

SELIMOVIC, D. et al. Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: An insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. **World J Hepatol**, v. 4, n. 12, p. 342-55, Dec 27 2012.

SHARP, S.; WORKMAN, P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. **Adv Cancer Res**, v. 95, p. 323-48, 2006.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 9, p. 558-67, Sep 2005.

SIMMONDS, P. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. **Gut**, v. 40, n. 3, p. 291-3, Mar 1997.

_____. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 11, p. 3173-88, Nov 2004.

SORIANO, V.; PETERS, M. G.; ZEUZEM, S. New therapies for hepatitis C virus infection. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 3, p. 313-20, Feb 1 2009.

STEINMANN, E. et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e103, Jul 2007.

SUHY, D. A. et al. Safe, long-term hepatic expression of anti-HCV shRNA in a nonhuman primate model. **Mol Ther**, v. 20, n. 9, p. 1737-49, Sep 2012.

SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z.; JARMOLOWSKI, A.; FIGLEROWICZ, M. RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. **Acta Biochim Pol**, v. 50, n. 1, p. 217-29, 2003.

TABARA, H. et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**, v. 99, n. 2, p. 123-32, Oct 15 1999.

TAKAYAMA, S.; REED, J. C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 9041-7, Dec 8 2003.

TALWANI, R. et al. Current status of treatment for chronic hepatitis C virus infection. **Drugs Today (Barc)**, v. 48, n. 3, p. 219-31, Mar 2012.

TERRAULT, N. A. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S99-105, Nov 2002.

TOHME, R. A.; HOLMBERG, S. D. Transmission of hepatitis C virus infection through tattooing and piercing: a critical review. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 8, p. 1167-78, Apr 2012.

TOMPKINS, S. M. et al. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 23, p. 8682-6, Jun 8 2004.

UJINO, S. et al. Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3. **J Biol Chem**, v. 284, n. 11, p. 6841-6, Mar 13 2009.

WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med**, v. 11, n. 7, p. 791-6, Jul 2005.

WATANABE, T.; UMEHARA, T.; KOHARA, M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 12, p. 1263-76, Oct 10 2007.

WAXMAN, L. et al. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 24, p. 13931-5, Nov 20 2001.

WEGELE, H.; MULLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 151, p. 1-44, 2004.

WELSH, M. J.; GAESTEL, M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 851, p. 28-35, Jun 30 1998.

YAMASHITA, T.; HONDA, M.; KANEKO, S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 6, p. 960-4, Jun 2011.

YU, J. Y.; DERUITER, S. L.; TURNER, D. L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6047-52, Apr 30 2002.

ZEISEL, M. B. et al. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. **J Hepatol**, v. 54, n. 3, p. 566-76, Mar 2011.

ZHENG, B. J. et al. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. **Antivir Ther**, v. 9, n. 3, p. 365-74, Jun 2004.

ZHONG, J. et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9294-9, Jun 28 2005.

Capítulo II

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Inhibition of HCV using siRNA targeted to the virus and heat shock proteins

**Ana Cláudia Silva Braga¹, Bruno Moreira Carneiro¹, Mariana Nogueira Batista¹,
Paula Rahal¹**

**¹Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto,
SP, Brazil**

Running head: HCV inhibition using siRNA to virus and HSP proteins

Hepatitis C is a consequence of infection by hepatitis C virus (HCV) and it is estimated that approximately 150 million people are chronically infected worldwide. Studies have demonstrated interactions between viral and host proteins during HCV replication cycle and these interactions might be used for development of new therapies against hepatitis C. The heat shock proteins (Hsp) consist of cellular proteins that interact with HCV proteins and the inhibition of these host proteins could reduce viral replication. In this study we knocked down the proteins Hsp90 and Hsp27 alone or in combination with the inhibition of viral regions 5'UTR, NS3 and NS5A by siRNA. All siRNA molecules developed direct to viral genome showed efficient inhibition of viral replication, especially the siRNA that targeted 5'UTR region. Inhibition of Hsp27 gene showed no reduction in levels of viral replication but the Hsp90 inhibition successfully reduced virus replication. The use of this molecule together with siRNA 5'UTR showed viral replication inhibition. In a repeated treatment, the siRNA directed to 5'UTR region showed great efficiency in reducing HCV replication and siRNA Hsp90 led to cell death, demonstrating the important role of this protein in cell survival. Finally this work suggests that the combination therapy of siRNAs can be an effective alternative to treat hepatitis C in patients with HCC once reduction of Hsp90 expression was effective on both tumor and HCV suppression.

Keywords: HCC, Hepatitis C, Hsp27, Hsp90, RNA interference, siRNA.

1.1 Introduction

Hepatitis C is caused by infection of hepatitis C virus (HCV) and it is estimated that approximately 150 million people are chronically infected worldwide (1). The current HCV antiviral therapy is a combination of pegylated interferon (peg-IFN), ribavirin (RBV) and protease inhibitors antivirals boceprevir and telaprevir (2). These triple therapy achieve a sustained virological response on 70% of patients (3). Thus, the discovery of new drugs and more effective treatments are needed. Therapy using RNA interference (RNAi) has proven to be an effective alternative in the treatment of various viral infections (4).

The mechanism of post transcriptional silencing of RNAi pathway has been a promising alternative for the inhibition of viral replication (4). However, due to the high mutation rate of HCV, the siRNA molecules may become ineffective after a longer treatment period. One alternative to prevent viral evasion would be to use siRNA targeting more conserved regions of the virus genome and the combination with siRNA to host proteins involved in viral replication cycle (5).

The HCV is a *Flaviviridae* family member and it is a small enveloped virus with a positive-sense, single-stranded RNA genome (6). The viral RNA encodes a polyprotein which is cleaved by cellular and viral proteases originating structural proteins (Core, E1, E2 and p7) and non-structural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) (6, 7).

During the replication cycle, several viruses require host molecular chaperones and those proteins are involved in entry, replication and assembly steps (8, 9). The Heat Shock Protein 90 (HSP90) has a key role on folding and maintaining the conformational integrity of a wide range cellular proteins (10). In mammalian cells there are two isoforms of Hsp90 (Hsp90 α and Hsp90 β), which are encoded by different

genes (11). It has been demonstrated that Hsp90 interacts with HCV viral proteins NS2 and NS3 (12, 13) and also form a complex with NS5A and FKBP8 essential for HCV replication (14).

Heat shock protein 27 (Hsp27) contributes to the stabilization of intracellular actin filaments and could play a regulatory role in the organization of the cytoskeleton (15). Also, studies demonstrated that Hsp27 is an interacting partner of the HCV NS5A protein (16) and same researchers also observed increased expression of Hsp27 in Huh7 cells containing a subgenomic HCV replicon in relation to Huh7 cells without replicon (17).

Therefore, the heat shock proteins Hsp90 and Hsp27 play a role in HCV replication and because of that may be a promising target to HCV drug development (16, 18). Moreover, combination therapies against both, the virus and host genes that support virus replication, are likely to be a potent approach in the treatment of hepatitis C (19). Therefore, in this study we reduced the HCV replication *in vitro* using siRNA molecules targeted to the viral genome in combination with siRNA targeted to cellular genes Hsp27 and Hsp90.

1.2 Materials and methods

Cell culture and HCV replicon cells

In order to establish a stably cell line expressing HCV subgenomic replicon SGR-JFH1 human hepatocyte derived cellular carcinoma cell line (Huh7) was used (20). The Huh7/SGR-JFH1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ G418 (Sigma-aldrich),

100 units mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. For all experiments, cells were plated 16 hours before the start of treatments at initial cell densities as follows: 1x10⁵ cells/well for 6-well-plate, 3x10⁴ cells/well for 24-well-plate and 5x10³ cell/well for 96-well-plate.

RNAi molecules and transfection

Commercial siRNAs were acquired for knockdown Hsp90 and Hsp27 mRNA: siRNA Hsp90 (SC-35608, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) and siRNA Hsp27 (EHU112501, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). For the viral genome we designed four siRNA molecules using the software siDirect 2.0 (21) for different regions of the HCV genome: siRNA 1 (5'UTR), siRNA 2 (5'UTR), siRNA 5 (NS3), siRNA 6 (NS5A), synthesized by Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA. As negative control, we used a siRNA non-targeting for any HCV sequence used in this study and any cellular mRNA. Based on others studies we selected three different concentrations for siRNA (25 nM, 75 nM and 50 nM) (22, 23) and the RNAi molecules were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer instruction.

Cell viability

Cells Huh7/SGR-JFH1 were initially cultured in 96-well-plate, transfected with the siRNA and analyzed 24h, 48h and 72h after transfection. Cell viability was analyzed by MTT assay (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). After treatment the supernatant was removed and 100 µl of 1 mg mL⁻¹ of MTT reagent dissolved in DMEM culture medium free of FBS and antibiotics were added. After incubation for 30 minutes at 37 °C the supernatant was removed and 100 µl of DMSO

were added (Sigma-aldrich, St, Louis, MO, USA). Reading was performed at 562 nm on plate reader spectrophotometer.

qPCR

Total RNA of siRNA treated cells was extracted using TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 2 µg of extracted RNA used on cDNA synthesis with the High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The mRNA expression of tested cellular genes were determined by real time PCR using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, CA, USA). The analysis of HCV expression was performed by TaqMan Universal PCR Master Mix no AmpErase UNG (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). The quality of the samples and normal levels of expression were obtained by amplification of the endogenous gene GAPDH. HCV RNA levels from cells treated with siRNAs were obtained by qPCR and compared with siRNA control. The primers and probes sequences are described in Supplementary Material.

Western Blot

Proteins were extracted from the cells in 6-well-plate using Cellytic MT (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). Total protein extract was quantified by BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) following manufacturer's instructions. Proteins (6µg) were subjected to electrophoresis on 10% denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). After blocking with 5% non-fat milk in TBS-T, membranes were incubated with primary antibodies: anti-NS3 at dilution 1:3000

(ab65407, Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-Hsp90 at dilution 1:1000 (ab13492, Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-HSP27 at dilution 1:1000 (ab2790, Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-GAPDH at dilution 1:5000 (ab8245, Abcam, Cambridge, MA, USA) overnight at 4°C, followed by further incubation with secondary antibody Rabbit polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG - H&L (HRP) at dilution 1:2000 (ab6728, Abcam, Cambridge, MA, USA).

Repeated treatment of siRNA

To evaluate the effects of repeated treatment with siRNA molecules, cells were transfected with different siRNAs in a 24-well-plate, every 4 days for 20 days. When the cells approached confluence, they were detached with Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco, by Life Technologies, Canada) and transferred into a plate with larger diameter, following the methodology previously described by Kukolj, McGibbon (24). To select only the cells containing the HCV replicon, culture medium was supplemented with 1 mg mL⁻¹ G418 (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) and fetal bovine serum was reduced to 3%, which was changed every 2 days. The absence of cells indicates the susceptibility to treatment and the presence of cells indicates resistance to treatment. As a positive control of HCV inhibition cyclosporine A was used (25). One group of cells was treated with siRNA Hsp90 and maintained in culture medium without antibiotic selection to observe only the cell growth under Hsp90 protein knockdown. After 20 days of treatment all plates were fixed with 10% formaldehyde and stained with 0,01% crystal violet.

Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate in two independent events. Data is presented as mean \pm SD. Numerical data was analyzed using student's t-test and ANOVA. P value $<0,05$ was considered statistically significant.

1.3 Results

In this study we transfected siRNA molecules in Huh7 cell line stably expressing HCV subgenomic replicon SGR-JFH1 to evaluate the interference on viral replication. We developed four siRNA molecules targeted to different regions of the SGR-JFH1 genome (**Table 1**). The first molecule was directed to the 5' untranslated region of the virus, corresponding to nucleotides 278-296. This siRNA is complementary to six genotypes of hepatitis C. The second, also located in the 5' untranslated region at position 361-379, has complementarity with genotypes 2a and 3. The siRNA 5, targeting to region 5010-5028, is directed to genotypes 1 and 2a. In which is inserted the gene encoding the NS3 protein. The siRNA is specific for the region 6652-6670 in NS5A protein gene and this molecule is specific to genotype 2a only. The E2 region (1586-1604) absent from the replicon SGR-JFH1, was used as target to siRNA control molecule.

The efficiency of RNAi knockdown their target genes (Hsp90 and Hsp27) was evaluated by the expression of these genes by qPCR. In the presence of siRNA Hsp90 the Hsp90 α and Hsp90 β genes expression was reduced (4 folds and 3.5 folds respectively) (**Fig. 1a, 1c**). In the presence of siRNA Hsp27 a reduction of the expression of its target gene (6 folds) was also observed (**Fig. 1b**). Differences in protein levels was observed by Western Blot, with reduced expression of proteins Hsp90 (**Fig. 1e**) and Hsp27 (**Fig. 1d**).

To evaluate the cytotoxicity of RNAi molecules cell viability assays were performed. The values obtained through the MTT assay demonstrated that siRNA molecules directed to the viral genome showed no toxicity using the tested concentrations. As for the siRNA molecules targeting cellular genes Hsp90 and Hsp27, we observed no cytotoxic effects for siRNA Hsp27, but siRNA Hsp90 showed reduced cell viability over time (**Table 2**). After 72 hours of transfection, cell viability was reduced to approximately 50%.

The siRNA molecules were then tested against HCV. All four siRNA targeting the virus were effective in reducing the SGR-JFH1 replication (more than 80% inhibition) (**Fig. 2a**). The same result was observed by western blot, with a reduction of NS3 viral protein expression (**Fig. 2c**). Knockdown of Hsp90 showed a reduction of viral replication, however the Hsp27 inhibition led to an increased expression of HCV more than 30% (**Fig. 2b** and **Fig. 2d**).

After confirmation of the efficiency of tested siRNA, they were tested in combination, one directed to a cellular gene (Hsp90) and another directed to the viral genome (siRNA 1, 2, 5 or 6). All combinations were effective in reducing viral replication and the best result was achieved in siRNA Hsp90/siRNA 2 (**Fig. 2e**).

Because inhibitory effect of siRNA is transient, Huh7/SGR-JFH1 cells were transfected with siRNA 2 and viral replication was evaluated until 6 days after transfection. We observed that the best suppression of HCV was observed in the 3rd day of treatment and that the molecule was efficient until the 6th day after transfection (**Fig. 3a**).

Considering that the use of molecules siRNA 2 and siRNA Hsp90 were effective in suppressing HCV, a repeated treatment with these two molecules together and separately were performed. Due to the presence of the resistance gene to G418,

cells expressing SGR-JFH1 replicon were viable at the end of treatment. The reduction in cell number during the treatment indicates the effectiveness of the siRNA molecule to inhibit viral replication. Cyclosporin A is an inhibitor of HCV and was used as a positive control. We observed a decline in cell density and this can be related to viral replication reduction (**Fig. 3c**).

Our results demonstrated that using the siRNA 2 molecule was effective in the inhibition of HCV as demonstrated by the absence of cells after 20 days of treatment (**Fig. 3b**). The use of siRNA molecule Hsp90 led to early cell death, even in treatments without selection antibiotic.

1.4 Discussion

Hepatitis C is a consequence of HCV infection and it is estimated that about 150 million people worldwide are chronically infected. Studies have demonstrated interactions between viral and host proteins during the replication cycle of HCV and these interactions can be used for the development of new therapies for hepatitis C. This work aimed to suppress HCV replication using RNA interference molecules (siRNA) targeted to viral regions and cellular genes from chaperones family, known to be important in virus replication.

The siRNA molecules targeting the viral genome showed no cytotoxic effects and the same result was observed by Ansar, Ashfaq (26). However, inhibition of Hsp90 gene decreased cell viability and after 16 days resulted in complete cell death. The chaperone Hsp90 is over expressed in tumors and tumor cell lines such as Huh7 and Watanabe, Behrns (27) demonstrated that inhibition of Hsp90 by 17-AAG (a geldanamycin derivative) decreases HCC cell growth both *in vitro* and *in vivo*. The

compound induced cell cycle arrest in G1 and G2/M cells in Huh7 and G2/M in Hep3B cell. Because stopping the cell cycle at G2/M decreases cell division, this cycle arrest is one of the mechanisms by which the drug inhibits the proliferation of HCC. Recent studies have shown that Hsp90 has an important role in tumorigenesis and tumor progression. Hsp90 also interacts with several proteins involved in tissue invasion, angiogenesis and metastasis of tumors (28, 29).

The results of SGR-JFH1 expression by qPCR demonstrated that the knockdown Hsp90 led to a reduction of viral replication. Other studies also observed these results and demonstrated reduced viral replication using siRNA molecules for Hsp90 α and Hsp90 β genes and chemical compounds such as geldanamycin and its derivatives (13, 18).

Despite studies have demonstrated an interaction between the cellular protein Hsp27 and viral protein NS5A (16), inhibition of this heat shock in our study increased viral replication. Recent studies have shown that inhibition of Hsp27 increased HBV expression, suggesting that this protein may have an important factor in intracellular antiviral activity (30). Other studies have also observed increased expression of Hsp27 in Huh7 cells containing an HCV subgenomic replicon compared to Huh7 cells without replicon (17). These data suggest that the protein Hsp27 may have an antiviral activity.

The use of siRNA molecules directed to the viral genome was effective in suppressing HCV replication, particularly the siRNA 2 targeted to 5'UTR region. The 5'UTR and the extreme end of the 3'UTR are the most conserved regions of HCV. The relatively conserved nature of these regions means they have functional importance in the viral life cycle (31). The target site of siRNA 2 molecule is conserved between genotypes 2a and 3 of HCV, which have a worldwide distribution.

Repeated cell treatment assay have also shown the efficiency of siRNA 2 in suppressing HCV. This result can be related to conserved characteristic of this region on HCV RNA (32, 33). Because siRNAs are highly sequence-specific and any sequence mismatches between the siRNA and the target affect the efficiency of RNAi, the 5'UTR would seen to be a ideal target for siRNA (34).

In this work we demonstrated that siRNA 2 molecule targeted to the 5'UTR region showed excellent levels of viral suppression and its combination with siRNA Hsp90 could be a powerful tool in the treatment of HCV positive patients who already exhibit enhanced hepatic damage, such as hepatocarcinoma, once the inhibition of Hsp90 protein shown to be effective in fighting both HCV and in suppressing the growth of cancer cells. However more studies are needed to achieve a safe and effective therapy in the fight against hepatitis. We also observed that Hsp27 knockdown showed a HCV replication increase and this protein may have an antiviral activity against hepatitis C virus.

Acknowledgements

This work was financially supported by Capes and FAPESP (grant number 2011/15786-4).

1.5 References

- 1 Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011; 17(2):107-15.
- 2 Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver D. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009; 49(4):1335-74.

- 3 Asselah T. Triple therapy with boceprevir or telaprevir for prior HCV non-responders. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2012; 26(4):455-62.
- 4 Motavaf M, Safari S, Alavian SM. Therapeutic potential of RNA interference: a new molecular approach to antiviral treatment for hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*. 2012; 19(11):757-65.
- 5 Samreen B, Khaliq S, Ashfaq UA, *et al*. Hepatitis C virus entry: role of host and viral factors. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012; 12(8):1699-709.
- 6 Giannini C, Brechot C. Hepatitis C virus biology. *Cell death and differentiation*. 2003; 10 Suppl 1:S27-38.
- 7 Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in virus research*. 2004; 63:71-180.
- 8 Tai AW, Benita Y, Peng LF, *et al*. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell host & microbe*. 2009; 5(3):298-307.
- 9 Moriishi K, Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Reviews in medical virology*. 2007; 17(5):343-54.
- 10 Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010; 11(7):515-28.
- 11 Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters*. 2004; 562(1-3):11-5.
- 12 Waxman L, Whitney M, Pollok BA, Kuo LC, Darke PL. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(24):13931-5.
- 13 Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284(11):6841-6.
- 14 Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, *et al*. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *The EMBO journal*. 2006; 25(20):5015-25.
- 15 Hino M, Kurogi K, Okubo MA, Murata-Hori M, Hosoya H. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000; 271(1):164-9.
- 16 Choi YW, Tan YJ, Lim SG, Hong W, Goh PY. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 318(2):514-9.
- 17 Fang C, Yi Z, Liu F, *et al*. Proteome analysis of human liver carcinoma Huh7 cells harboring hepatitis C virus subgenomic replicon. *Proteomics*. 2006; 6(2):519-27.
- 18 Nakagawa S, Umehara T, Matsuda C, Kuge S, Sudoh M, Kohara M. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007; 353(4):882-8.
- 19 Khaliq S, Khaliq SA, Zahur M, *et al*. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. *Biotechnology advances*. 2010; 28(1):27-34.
- 20 Kato T, Date T, Miyamoto M, *et al*. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 2003; 125(6):1808-17.
- 21 Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC bioinformatics*. 2009; 10:392.

- 22 Khaliq S, Jahan S, Ijaz B, Ahmad W, Asad S, Hassan S. Inhibition of hepatitis C virus genotype 3a by siRNAs targeting envelope genes. *Archives of virology*. 2011; 156(3):433-42.
- 23 Sagan SM, Nasheri N, Luebbert C, Pezacki JP. The efficacy of siRNAs against hepatitis C virus is strongly influenced by structure and target site accessibility. *Chemistry & biology*. 2010; 17(5):515-27.
- 24 Kukolj G, McGibbon GA, McKercher G, *et al*. Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280(47):39260-7.
- 25 Ishii N, Watashi K, Hishiki T, *et al*. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *Journal of virology*. 2006; 80(9):4510-20.
- 26 Ansar M, Ashfaq UA, Shahid I, *et al*. Inhibition of full length hepatitis C virus particles of 1a genotype through small interference RNA. *Virology journal*. 2011; 8:203.
- 27 Watanabe G, Behrns KE, Kim JS, Kim RD. Heat shock protein 90 inhibition abrogates hepatocellular cancer growth through cdc2-mediated G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2009; 64(3):433-43.
- 28 Stingl L, Stuhmer T, Chatterjee M, Jensen MR, Flentje M, Djuzenova CS. Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitise tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. *British journal of cancer*. 2010; 102(11):1578-91.
- 29 Leng AM, Liu T, Yang J, *et al*. The apoptotic effect and associated signalling of HSP90 inhibitor 17-DMAG in hepatocellular carcinoma cells. *Cell biology international*. 2012; 36(10):893-9.
- 30 Tong SW, Yang YX, Hu HD, *et al*. HSPB1 is an intracellular antiviral factor against hepatitis B virus. *Journal of cellular biochemistry*. 2013; 114(1):162-73.
- 31 Radhakrishnan SK, Layden TJ, Gartel AL. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology*. 2004; 323(2):173-81.
- 32 Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of general virology*. 2004; 85(Pt 11):3173-88.
- 33 Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A, Ali Ashfaq U, Hassan S. Down-regulation of IRES containing 5'UTR of HCV genotype 3a using siRNAs. *Virology journal*. 2011; 8:221.
- 34 Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, *et al*. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO reports*. 2003; 4(6):602-8.

TABLES

Table 1 Description of siRNA molecules directed to the viral genome with name, target region, genotypes complementarity and sequence.

Name	Region	Target	Genotypes	Sequence
siRNA 1	5'UTR	278-296	1; 2; 3; 4; 5; 6	5'- CUUGUGGUACUGCCUGAUAtt -3' 3'- cgGAACACCAUGACGGACUAU -5'
siRNA 2	5'UTR	361-379	2a; 3	5'- CAAAGAAAAACCAAAAGAAAtt -3' 3'- gaGUUUCUUUUUGGUUUUCUU -5'
siRNA 5	NS3	5010-5028	1; 2a	5'- GUGUCAAGACCAUCUUGAAAtt -3' 3'- caCACAGUUCUGGUAGAACUU -5'
siRNA 6	NS5A	6652-6670	2a	5'- GUCGUACUCCUAUGUAACAAtt -3' 3'- ccCAGCAUGAGGAUACAUUGU -5'
siRNA control	E2	1586-1604	1; 2a	5'- CCAACGGCAGUUGGCACAAtt -3' 3'- gtGGUUGCCGUCAACCGUGUA -5'

Table 2 Cell viability obtained by MTT assay. Values obtained in the use of siRNA molecules to genome viral in Huh7/SGR-JFH1 cell line and (\pm) mean standard deviation.

		24h	48h	72h
siRNA 1	25nM	101.5 \pm 11.4	101.9 \pm 9.7	87.3 \pm 10.7
	50nM	107.2 \pm 9.0	101.6 \pm 8.9	92.0 \pm 15.0
	75nM	105.9 \pm 11.3	96.0 \pm 8.2	88.6 \pm 14.4
siRNA 2	25nM	94.6 \pm 12.2	93.0 \pm 9.7	93.4 \pm 13.8
	50nM	102.1 \pm 10.5	99.1 \pm 8.8	93.6 \pm 8.6
	75nM	101.3 \pm 9.9	99.7 \pm 6.3	92.8 \pm 12.8
siRNA 5	25nM	97.2 \pm 10.4	115.3 \pm 5.0	108.4 \pm 11.1
	50nM	100.9 \pm 14.8	115.8 \pm 9.3	116.2 \pm 13.1
	75nM	100.9 \pm 9.2	118.1 \pm 3.6	107.7 \pm 4.3
siRNA 6	25nM	102.7 \pm 5.1	107.2 \pm 12.0	100.9 \pm 4.2
	50nM	103.4 \pm 6.1	109.4 \pm 10.9	101.9 \pm 9.9
	75nM	101.2 \pm 12.2	108.6 \pm 8.5	98.4 \pm 6.1
siRNA Hsp90	25nM	108.4 \pm 2.3	81.7 \pm 11.2	50.7 \pm 3.3
	50nM	111.6 \pm 2.1	84.3 \pm 4.7	45.8 \pm 2.8
	75nM	102.0 \pm 0.2	75.8 \pm 2.4	46.6 \pm 5.6
siRNA Hsp27	25nM	104.7 \pm 5.5	105.2 \pm 1.0	104.2 \pm 1.4
	50nM	103.0 \pm 9.2	97.7 \pm 2.6	98.0 \pm 1.7
	75nM	97.7 \pm 7.2	97.6 \pm 4.2	93.1 \pm 2.3

FIGURES

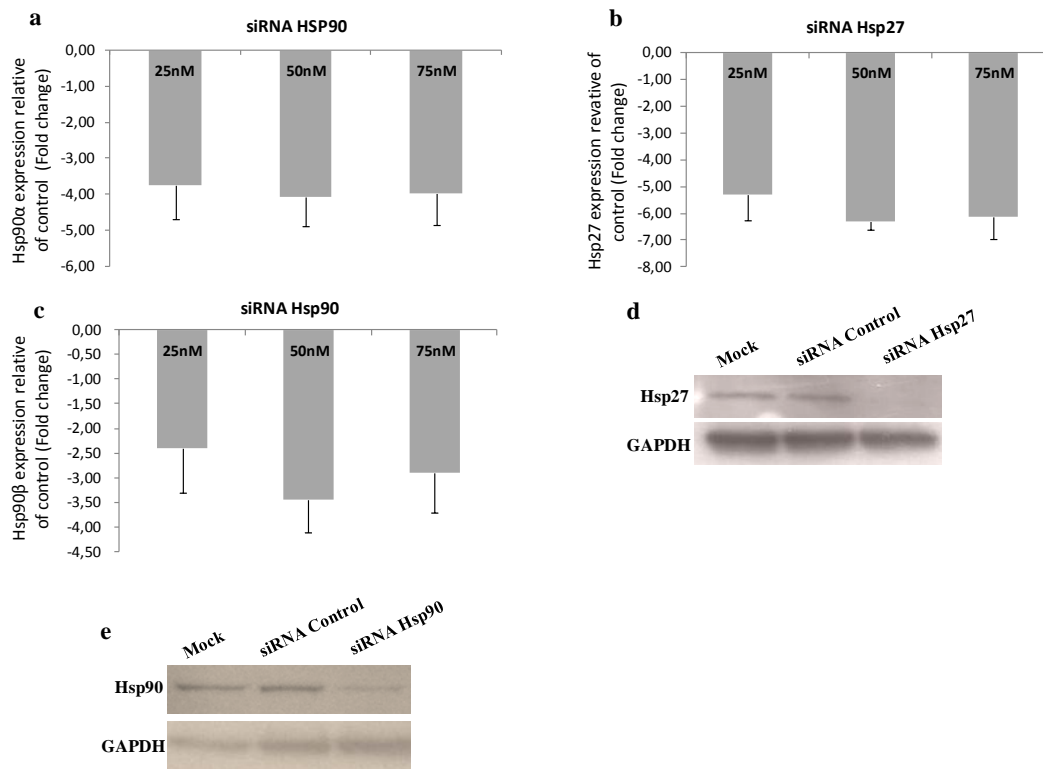


Fig. 1 Inhibition of cellular genes Hsp90 and Hsp27 by siRNA. (a) Hsp90 α gene expression under treatment of siRNA Hsp90; (b) Hsp27 gene expression under treatment of siRNA Hsp27; (c) Hsp90 β gene expression under treatment of siRNA Hsp90; (d) Hsp27 protein levels by Western Blot under treatment of siRNA molecules; (e) Hsp90 protein levels by Western Blot under treatment of siRNA molecules.

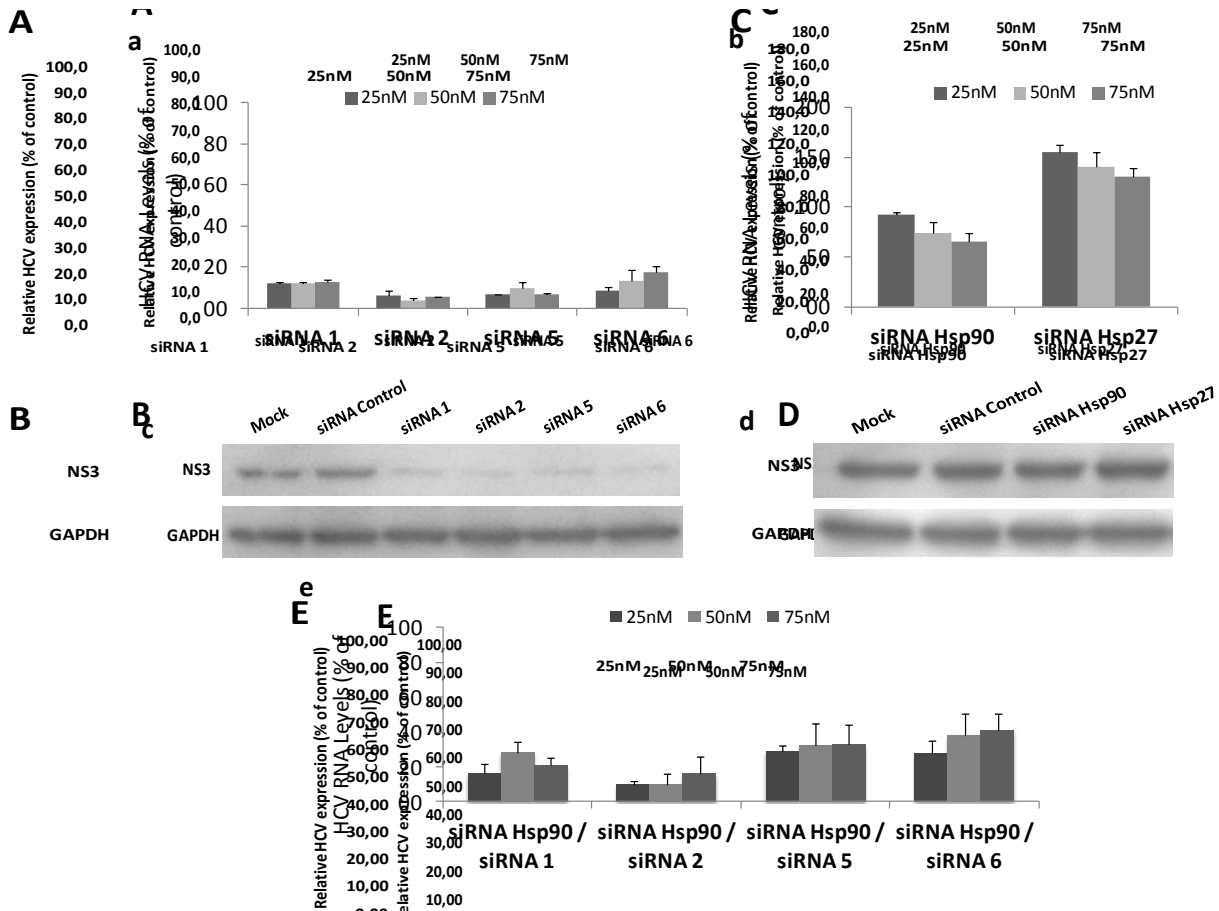


Fig. 2 HCV expression under influence siRNAs. (a) HCV expression under treatment of siRNA targeted to viral genome; (b) HCV expression under treatment of siRNA targeted to cell genes; (c) Western Blot of NS3 viral protein under treatment of siRNA targeted to viral genome; (d) Western Blot of NS3 viral protein under treatment of siRNA targeted to cell genes; (e) HCV expression under treatment of siRNA combination.

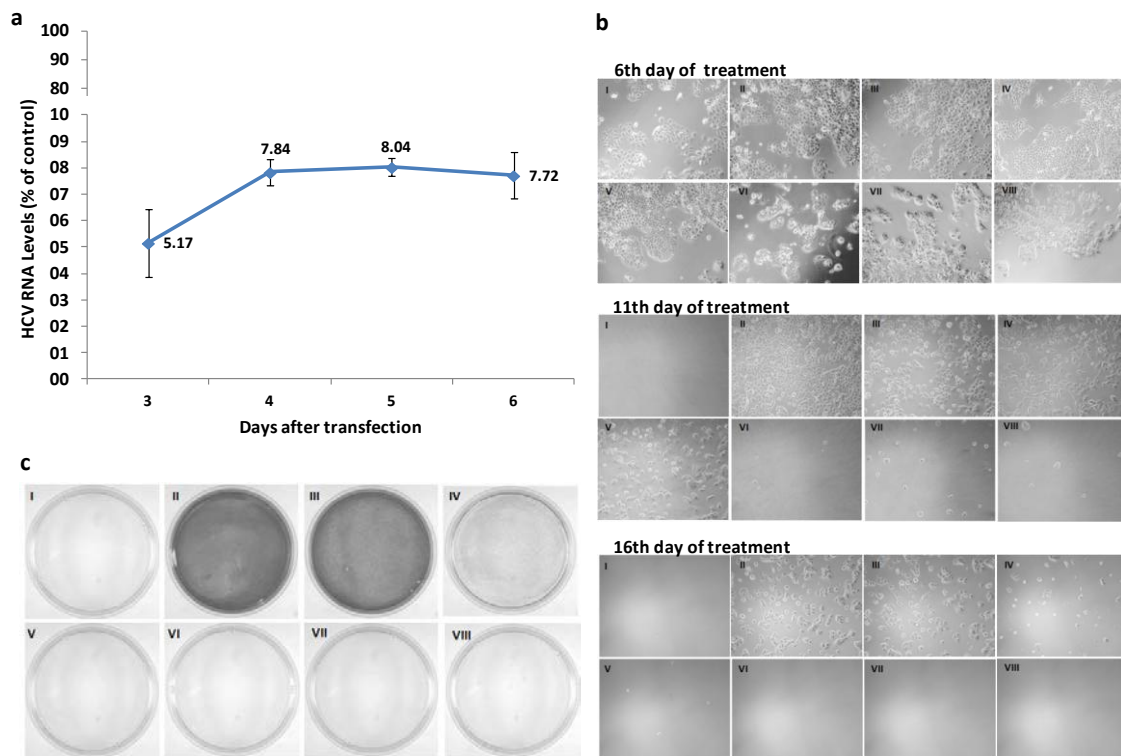


Fig. 3 Effects of siRNA molecules in repeated treatment. I- Huh7; II- Huh7/SGR-JFH1; III- Lipofectamine; IV- Cyclosporine; V- siRNA 2; VI-siRNA Hsp90; VII- siRNA 2/siRNA Hsp90; VIII- siRNA Hsp90 without G418. (a) Operating time of the siRNA 2 on HCV replication; (b) Cells during treatment with siRNA molecules; (c) Cells treated with siRNA for 20 days and stained with crystal violet.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material: Nucleotide sequences of the primers and probes used in qPCR for amplifying target genes.

Gene	Primer sequence 5' - 3'	Probe sequence 5' - 3'
Hsp90 α	F - TCTTTACTGAACTGGCGGAAG R - CCGATTTTGAGAGTCTTCGTG	not applicable
Hsp90 β ¹	F - GGCAGTCAAGCACTTTTCTGTAG R - GTCAACCACACCACGGATAAA	not applicable
Hsp27	F - GAGATCACCGGCAAGCACGA R - GGCGGCAGTCTCATCGGATT	not applicable
GAPDH	F - ACCCACTCCTCCACCTTTGA R - CTGTTGGTGTAGCCAAATTCGT	not applicable
HCV 5' UTR ²	F - CGGGAGAGCCATAGTGG R - AGTACCAACAAGGCCTTTCG	6-FAM-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-TAMRA
GAPDH	F - GGTGGTCTCCTCTGACTT R - CCAAATTCGTTGTCATACCAGGAAATG	6-FAM-CGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGC-TAMRA

¹Yao JQ, Liu QH, Chen X, Yang Q, Xu ZY, Hu F, Wang L, Li JM (2010) Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the proliferation of ARPE-19 cells. *Journal of biomedical science* 17:30

²Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M (1999) Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 116:636-642

Capítulo III

1 DISCUSSÃO

A hepatite C é uma questão de saúde pública mundial e sua progressão silenciosa, aliada à ineficiência do tratamento fazem da infecção pelo HCV um dos principais responsáveis pela necessidade de transplantes de fígado. Com isso, a descoberta por novas drogas e tratamentos mais eficazes é necessária, e nesse âmbito a terapia baseada na via do RNA de interferência tem se mostrado uma alternativa segura e eficaz no combate à diversas infecções virais como influenza, RSV e até mesmo o HCV.

Este trabalho teve como principal objetivo reduzir a replicação do HCV utilizando-se moléculas de RNA de interferência (siRNA) direcionados para regiões virais e para dois genes celulares da família das chaperonas, importantes na replicação do vírus.

Foram testadas quatro moléculas de siRNA direcionadas ao genoma viral (siRNA 1, siRNA 2, siRNA5 e siRNA 6) e os ensaios de viabilidade celular não apresentaram efeitos citotóxicos destas moléculas. ANSAR et al. (2011) também não observaram alterações da viabilidade de Huh7 quando a cultura foi submetida a tratamentos com siRNA direcionados ao genoma viral, assim como XING et al. (2012) que utilizaram concentrações de 100nM e combinações de siRNAs. Uma das vantagens na terapia baseada no RNAi é que ela mimetiza um processo celular natural e assim reduzem a ocorrência de toxicidade, que geralmente ocorre quando se introduz compostos estranhos ao organismo (MANOHARAN, 2003). TREJO-AVILA et al. (2007) utilizaram moléculas de siRNA direcionadas para a região NS5B do HCV em concentrações de até 400nM e não observaram redução da viabilidade de células Huh7.

A utilização de moléculas de siRNA direcionadas para genes celulares importantes na replicação do HCV também foram avaliadas quanto aos efeitos citotóxicos que poderiam desencadear nas células. A inibição da chaperona Hsp27 não apresentou alterações significativas nos ensaio de viabilidade. Entretanto a supressão de Hsp90 apresentou uma queda drástica na viabilidade celular e estes resultados puderam ser confirmados em ensaios em longo prazo com o RNAi em questão, que culminaram com a completa morte celular.

A chaperona Hsp90 é muito expressa em tumores e linhagens celulares tumorais como a Huh7. WATANABE et al. (2009) demonstraram que a inibição de Hsp90 por 17-AAG (um derivado de geldanamicina) diminui o crescimento celular de

hepatocarcinoma (HCC) tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O composto induziu a parada do ciclo celular em G1 e G2/M em células Huh7 e G2/M em células Hep3B. Como a parada de G2/M diminui a divisão celular, esta parada do ciclo é um dos mecanismos pelo qual a droga inibe a proliferação do HCC. Recentes estudos tem demonstrado que Hsp90 participa de um importante papel na tumorigênese e progressão tumoral. Particularmente, diversas proteínas clientes de Hsp90 estão envolvidas na invasão de tecidos, angiogênese e metástase de tumores (STINGL et al., 2010; LENG et al., 2012). AYRAULT et al. (2009) relataram que a droga 17-DMAG induz a apoptose de células de meduloblastoma de uma maneira dependente de p53 e SHAN et al. (2011) utilizaram vários compostos derivados de geldanamicina e a maioria levou à redução da viabilidade de células Huh7. Devido ao fato da linhagem celular utilizada nesse estudo (Huh7) ser derivada de HCC a inibição da Hsp90 levou à morte celular, demonstrando estar envolvida nos processos tumorais e de regulação do ciclo celular.

Os resultados de expressão do replicon do HCV demonstraram que a supressão da chaperona Hsp90 levou a uma redução da replicação viral. Estes resultados vão de encontro com outros trabalhos da literatura como o de NAKAGAWA et al. (2007) que reduziram a replicação viral utilizando moléculas de siRNA para os gene Hsp90 α e Hsp90 β , além de compostos químicos como a geldanamicina (GA) e seus derivados (17-DMAG).

Apesar de estudos terem demonstrado por co-imunoprecipitação uma interação entre a proteína celular Hsp27 e a proteína viral NS5A (CHOI et al., 2004), a inibição da *heat shock* em nosso estudo não levou à redução da replicação viral. Estudos recentes com hepatite B demonstraram que a inibição da proteína Hsp27 levou a um aumento da expressão do HBV, sugerindo que esta proteína pode ser um importante fator intracelular na atividade antiviral (TONG et al., 2013). Na China, uma droga denominada bicyclol tem sido utilizada em testes clínicos no combate às hepatites B e C (LIU, 2009). Apesar dos mecanismos de ação antiviral desta droga ainda não estarem bem estabelecidos foi demonstrado seu efeito no aumento da expressão de proteínas de choque térmico como Hsp27 e Hsp70 (BAO; LIU, 2008). Estes dados sugerem que a proteína Hsp27 representa um mecanismo de defesa celular, desempenhando uma atividade antiviral e não de auxílio do HCV nos processos de replicação.

As moléculas siRNA 1 e siRNA 2 tiveram como sítio alvo a região 5'UTR que, além de ser altamente conservada, é a região necessária para a tradução da poliproteína viral. Moléculas de siRNA e vetores de shRNA voltados para este mesmo

sítio resultaram em uma inibição de 80% do HCV (YOKOTA et al., 2003). A região 5'UTR é um importante alvo de terapias antivirais devido ao seu alto grau de conservação, tanto em estrutura secundária quanto terciária. Isso reflete sua importância funcional no ciclo de replicação do HCV visto que as sequências nucleotídicas estão conservadas em todos os genótipos do vírus (RADHAKRISHNAN; LAYDEN; GARTEL, 2004; MOTAVAF; SAFARI; ALAVIAN, 2012).

A molécula siRNA 5 foi direcionado para a região viral NS3 e apresentou bons índices de inibição do HCV. Estes resultados corroboram com os dados descritos por KIM et al. (2006) que, partindo do monitoramento de 36 moléculas de siRNA, observaram uma boa eficiência das moléculas voltadas para esta região viral, além de outras regiões como core, NS4A e NS4B. Outros estudos também demonstraram eficiência de moléculas voltadas para as regiões E2, NS3 e NS5B na supressão viral (PRABHU et al., 2005).

A molécula siRNA 6 também apresentou bons resultados na inibição do HCV, entretanto com taxas menores de supressão. Apesar da ligação do siRNA levar à degradação do mRNA como um todo, o sítio para o qual o siRNA foi desenvolvido pode apresentar estruturas secundárias e fatores que reduzem sua eficiência de ligação ao mRNA (KIM et al., 2006). O siRNA 6 foi direcionado para a região NS5A do HCV, uma importante região de estudo à antivirais. Inibidores de NS5A em desenvolvimento clínico demonstraram se ligar ao domínio I desta proteína, cujo papel na regulação da replicação viral permanece obscuro. O Daclatasvir, o primeiro inibidor em teste na fase clínica, demonstrou potente atividade antiviral *in vitro* contra todos os genótipos do HCV e nos testes clínicos em monoterapia mostrou-se eficiente para portadores do genótipo 1 (GAO et al., 2010). Entretanto, assim como diversos fármacos utilizados no combate ao HCV o Daclastavir apresenta mutações que conferem resistência viral à droga (SARRAZIN et al., 2012).

Em todos os testes de inibição viral com siRNA não foram observadas relações de dose-dependência significativas. Isso pode ser devido à saturação da via do RNA de interferência que atingiu seu patamar de silenciamento. Quando quantidades excessivas de siRNA são utilizadas observa-se uma redução da eficiência de inibição. Isso pode estar relacionado à uma competição pelas proteínas da via do RNAi que regulam a expressão gênica das células (SUHY et al., 2012).

Devido ao fato do siRNA persistir por poucos dias depois de sua entrega na célula, a repetição do tratamento se faz necessária para manter os níveis

intracelulares de RNAi. A alta especificidade da sequência de siRNA combinado com o tratamento prolongado podem promover a seleção de vírus mutantes resistentes ao siRNA. Existe evidencia experimental de que o uso contínuo de um siRNA resultou na acumulação de mutações em múltiplos pontos quando direcionado para a região NS5B (WILSON; RICHARDSON, 2005). CHANDRA et al. (2012) também observaram a ocorrência de mutações no uso prolongado de siRNA para 5'UTR, inclusive em regiões externas ao sítio alvo da molécula. Entretanto, a utilização de duas moléculas em conjunto foi capaz de eliminar a ocorrência de resistentes.

Para verificar estas hipóteses foram realizados testes de inibição do HCV combinando duas moléculas de siRNA, uma voltada para o gene Hsp90 e outra voltada para o genoma viral. Apesar das moléculas de siRNA direcionadas para o genoma viral terem sido mais eficientes em suprimir a replicação do HCV quando utilizadas separadamente a abordagem da terapia combinada ainda se faz importante para tentar evitar a ocorrência de escapes virais. XING et al. (2012) demonstraram que a utilização conjunta de siRNAs apresentaram uma maior eficiência quando ambos foram ministrados em baixas concentrações (0,1nM e 10nM). Entretanto, em concentrações maiores (100nM) não foi evidenciado um aumento da eficiência dos siRNA em conjunto em relação ao tratamento com as moléculas isoladas.

Buscou-se então conhecer o tempo de atuação da molécula de siRNA dentro da célula e para isso a expressão do HCV foi acompanhada em presença de um dos siRNA voltados ao genoma viral. Os resultados demonstraram uma boa estabilidade e capacidade de supressão do HCV por até seis dias. KONISHI et al. (2006) também observaram o efeito supressor de uma molécula de siRNA sobre o HCV por cinco dias após sua transfecção. Outros estudos detectaram a presença de siRNA fluorescentes dentro das células alvo por até 10 dias, entretanto a molécula foi considerada estável (sem perda da fluorescência) por sete dias (CHANDRA et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A fim de avaliar os efeitos de um tratamento a longo prazo com RNAi, as células foram tratadas com siRNA e acompanhadas ao longo de 20 dias, sendo mantidas em meio com antibiótico G418 para a seleção de resistentes. Como controle positivo foi utilizado o composto Ciclosporina A, que tem sido demonstrado por exibir um efeito inibitório da replicação do vírus da hepatite C, tanto em pacientes quanto em modelos celulares com replicon (INOUE et al., 2003). A molécula para a região 5'UTR (siRNA 2) foi eficiente na inibição viral, apresentando índices melhores que os observados no

controle positivo. A molécula siRNA Hsp90 levou a morte celular, inclusive no grupo de células sem G418, portanto esta morte não foi atribuída à supressão do HCV mas sim a morte celular por consequência da inibição da proteína Hsp90. Com isso não foi possível avaliar os efeitos em longo prazo utilizando o conjunto siRNA 2/siRNA Hsp90. CHANDRA et al. (2012) observaram a ocorrência de resistência viral quanto utilizadas moléculas isoladas de siRNA por 60 dias mas a combinação de duas destas moléculas evitaram o surgimento da resistência.

O presente trabalho reafirma o importante papel desempenhado pela proteína Hsp90 na sobrevivência das células, especialmente nos processos tumorais. A molécula de siRNA direcionada para a região 5'UTR apresentou excelentes índices de supressão viral e sua combinação com siRNA Hsp90 poderia ser uma potente ferramenta no tratamento de pacientes HCV positivos que já apresentem um dano hepático avançado, como o hepatocarcinoma, uma vez que a inibição da proteína Hsp90 demonstrou-se eficiente tanto no combate ao HCV quanto na supressão do crescimento de células cancerígenas. Entretanto mais estudos são necessários para se alcançar uma terapia segura e eficaz no combate à hepatite C.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSAR, M. et al. Inhibition of full length hepatitis C virus particles of 1a genotype through small interference RNA. **Viol J**, v. 8, p. 203, 2011.

AYRAULT, O. et al. Inhibition of Hsp90 via 17-DMAG induces apoptosis in a p53-dependent manner to prevent medulloblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 40, p. 17037-42, Oct 6 2009.

BAO, X. Q.; LIU, G. T. Bicyclol: a novel antihepatitis drug with hepatic heat shock protein 27/70-inducing activity and cytoprotective effects in mice. **Cell Stress Chaperones**, v. 13, n. 3, p. 347-55, Sep 2008.

CHANDRA, P. K. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. **Mol Ther**, v. 20, n. 9, p. 1724-36, Sep 2012.

CHOI, Y. W. et al. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 318, n. 2, p. 514-9, May 28 2004.

GAO, M. et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. **Nature**, v. 465, n. 7294, p. 96-100, May 6 2010.

INOUE, K. et al. Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. **J Gastroenterol**, v. 38, n. 6, p. 567-72, 2003.

KIM, M. et al. Inhibition of hepatitis C virus gene expression by small interfering RNAs using a tri-cistronic full-length viral replicon and a transient mouse model. **Virus Res**, v. 122, n. 1-2, p. 1-10, Dec 2006.

KONISHI, M. et al. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. **J Viral Hepat**, v. 13, n. 11, p. 756-61, Nov 2006.

LENG, A. M. et al. The apoptotic effect and associated signalling of HSP90 inhibitor 17-DMAG in hepatocellular carcinoma cells. **Cell Biol Int**, v. 36, n. 10, p. 893-9, Oct 1 2012.

LIU, G. T. Bicyclol: a novel drug for treating chronic viral hepatitis B and C. **Med Chem**, v. 5, n. 1, p. 29-43, Jan 2009.

MANOHARAN, M. RNA interference and chemically modified siRNAs. **Nucleic Acids Res Suppl**, v., n. 3, p. 115-6, 2003.

MOTAVAF, M.; SAFARI, S.; ALAVIAN, S. M. Therapeutic potential of RNA interference: a new molecular approach to antiviral treatment for hepatitis C. **J Viral Hepat**, v. 19, n. 11, p. 757-65, Nov 2012.

NAKAGAWA, S. et al. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 4, p. 882-8, Feb 23 2007.

PRABHU, R. et al. Small interfering RNA effectively inhibits protein expression and negative strand RNA synthesis from a full-length hepatitis C virus clone. **J Med Virol**, v. 76, n. 4, p. 511-9, Aug 2005.

RADHAKRISHNAN, S. K.; LAYDEN, T. J.; GARTEL, A. L. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. **Virology**, v. 323, n. 2, p. 173-81, Jun 1 2004.

SARRAZIN, C. et al. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v. 56 Suppl 1, p. S88-100, 2012.

SHAN, G. Z. et al. A novel class of geldanamycin derivatives as HCV replication inhibitors targeting on Hsp90: synthesis, structure-activity relationships and anti-HCV activity in GS4.3 replicon cells. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 64, n. 2, p. 177-82, Feb 2011.

STINGL, L. et al. Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitise tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. **Br J Cancer**, v. 102, n. 11, p. 1578-91, May 25 2010.

SUHY, D. A. et al. Safe, long-term hepatic expression of anti-HCV shRNA in a nonhuman primate model. **Mol Ther**, v. 20, n. 9, p. 1737-49, Sep 2012.

TONG, S. W. et al. HSPB1 is an intracellular antiviral factor against hepatitis B virus. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 1, p. 162-73, Jan 2013.

TREJO-AVILA, L. et al. Antiviral therapy: inhibition of Hepatitis C Virus expression by RNA interference directed against the NS5B region of the viral genome. **Ann Hepatol**, v. 6, n. 3, p. 174-80, Jul-Sep 2007.

WATANABE, G. et al. Heat shock protein 90 inhibition abrogates hepatocellular cancer growth through cdc2-mediated G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 64, n. 3, p. 433-43, Aug 2009.

WILSON, J. A.; RICHARDSON, C. D. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. **J Virol**, v. 79, n. 11, p. 7050-8, Jun 2005.

XING, X. K. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by single and dual small interfering RNA using an HCV-infected cell model. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 2, p. 295-301, Feb 2012.

YOKOTA, T. et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. **EMBO Rep**, v. 4, n. 6, p. 602-8, Jun 2003.