



Bruno Moreira Carneiro

Estudo *in vitro* do efeito da interferência por RNA (RNAi) na
replicação do vírus da hepatite C

São José do Rio Preto
2013

Bruno Moreira Carneiro

Estudo *in vitro* do efeito da interferência por RNA (RNAi) na
replicação do vírus da hepatite C

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração - Biologia Celular e Molecular, 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

São José do Rio Preto
2013

Bruno Moreira Carneiro

Estudo in vitro do efeito da interferência por RNA (RNAi) na
replicação do vírus da hepatite C

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

Comissão Examinadora

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

Profa. Dra. Clarice Arns
UNICAMP - Campinas

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior
UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a Cristiane Damas Gil
UNIFESP – São Paulo

São José do Rio Preto
15 de agosto de 2013

Dedico este trabalho

Em memória do meu pai Maurílio que me ensinou e incentivou a sempre caminhar com
as próprias pernas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Paula Rahal, pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho e, especialmente, pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação.

À minha esposa Sabrina por seu amor e por estar sempre ao meu lado e aos meus queridos pais Rita e Maurílio e minha irmã Lise pelo carinho e incentivo em todos os momentos da minha caminhada, incondicionalmente.

Ao Dr. Mark Harris por ter aberto as portas de seu laboratório na University of Leeds no qual parte deste projeto foi desenvolvido e por suas sempre pertinentes contribuições científicas à este projeto.

Ao Dr. Jonny Yokosawa, que apesar da distância me socorreu nos momentos cruciais.

À Ana Cláudia e Mariana, minhas ex-estagiárias, pela ajuda em todas as etapas deste projeto sem elas a caminhada teria sido muito mais difícil.

Aos colegas Paola, Marília, Ana Carolina Jardim, Cíntia, Caroline Bonfim, Marina, Lilian, André, Bruna, Natália, Renata, Henrique, Ana Beatriz, Guilherme, Jaqueline, Rodolfo, Marina, Lucas, Karina, Mônica, Letícia, Álvaro, Raphael, Gabriel do

laboratório de estudos genômicos pelos inúmeros auxílios, discussões, risadas e pausas para o café, fazendo com que esses quatro anos fossem muito mais agradáveis.

À todos do laboratório de virologia da University of Leeds, especialmente ao Joseph Shaw, Bjorn-Patrick Mohl, Zsofia Igloi e Douglas Ross que me acolheram e me ajudaram a me adaptar mais rapidamente à nova cultura e meteorologia.

À Lenira que sempre me deu total suporte nos bastidores e fez com que toda a burocracia ficasse mais fácil.

Aos professores do programa de pós-graduação em Genética pela contribuição na minha formação.

À FAPESP e a CAPES pelo financiamento deste projeto.

E a todos os outros que aqui não foram citados, mas que com certeza serei eternamente grato.

*“If I have seen further,
it's by standing on the
shoulder of giants.”*

Isaac Newton

RESUMO

A Hepatite C é a inflamação do fígado causada pela infecção pelo vírus da hepatite C (HCV). Essa inflamação ocorre na maioria das pessoas infectadas pelo vírus e, dependendo da intensidade e tempo de duração, pode levar à cirrose e câncer do fígado. No momento não existem vacinas eficazes e o tratamento convencional com peg-IFN e ribavirina tem eficácia bastante limitada e efeitos colaterais graves. Terapias moleculares utilizando a RNAi demonstraram ser eficientes na inibição deste vírus *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes metodologias para inibição da replicação do HCV utilizando-se da técnica de RNAi. Foram desenvolvidas 5 moléculas de dicer substrate siRNA, que em sua maioria foram capazes de reduzir a replicação viral em até 90% em relação ao controle negativo. Ainda, não foi observada a seleção de mutantes resistentes do vírus após o tratamento com os DsiRNAs por 21 dias. Também foram desenvolvidos 3 vetores lentivirais contendo sequências codificantes de shRNA contra o HCV. Com a utilização destas partículas lentivirais foi possível reduzir a replicação do HCV em aproximadamente 99% em relação ao controle negativo. Neste estudo foi demonstrado que o HCV pode ser inibido eficientemente utilizando tecnologias distintas de RNAi. Os DsiRNAs são mais potentes que os tradicionais siRNAs e com menor probabilidade de selecionar mutantes resistentes. Os vetores lentivirais são eficientes na entrega dos genes contendo os shRNAs e potentes na inibição do HCV. Ambas as tecnologias no futuro poderão ser utilizadas na terapia alternativa de pacientes crônicos ou no caso dos DsiRNAs de forma preventiva à infecção.

Palavras-chave: vírus da hepatite C, dicer substrate siRNAs, vetores lentivirais, RNA de interferência.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) frequently establishes persistent infections in the liver, leading to the development of chronic hepatitis, and, potentially, to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma at later stages. No vaccine is available for HCV and the current standard of care, which consists of pegylated interferon- α and ribavirin, has limited efficacy against certain HCV genotypes, and also produces significant adverse effects. Molecular therapies have proven to be effective in the inhibition of the virus in vitro. Molecular therapies based on RNAi has shown good efficiency on knockdown of HCV in vitro. The aim of this study was to develop different methodologies for inhibiting HCV replication using the RNAi technique. We developed five dicer substrate siRNA molecules, which mostly were able to reduce viral replication by 90% compared to the negative control. Still, there was no selection of resistant mutants of the virus after treatment with DsiRNAs for 21 days. In addition, we developed lentiviral vectors containing sequences encoding shRNA against HCV. With the use of these lentiviral particles, it was possible to reduce HCV replication by approximately 99% compared to negative control. In this study, it was demonstrated that HCV could be effectively inhibited using different RNAi technologies. The DsiRNAs are more powerful than traditional siRNAs and less likely to select resistant mutants. The lentiviral vectors are efficient in delivery of genes containing shRNAs and potent in the inhibition of HCV. Both technologies in the future may be used in alternative therapy for chronic patients or in case of DsiRNAs preventively to infection.

Keywords: hepatitis C virus, dicer substrate siRNAs, lentiviral vectors, RNA interference

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Prevalência HCV no mundo e genótipos predominantes.....	28
Figura 1.2 Organização do genoma do HCV.....	35
Figura 1.3 Esquema de entrada do HCV na célula.....	42
Figura 1.4 Estrutura da região 5' UTR.....	46
Figura 1.5 Esquema da via de RNAi.....	61
Figura 2.1 Posição aproximada dos alvos dos DsiRNAs.....	129
Figura 2.2a Efeito da transfecção de DsiRNA controle negativo.....	129
Figura 2.2b Níveis de inibição do SGR-JFH-1 com diferentes concentrações de DsiRNAs.....	129
Figura 2.3 Níveis de inibição do SGR-JFH-1 com diferentes DsiRNAs.....	129
Figura 2.4 Western Blot de SGR-JFH-1 tratadas com diferentes DsiRNAs anti-HCV.....	130
Figura 2.5a Inibição do J6/JFH-1 em células pré-tratadas com DsiRNAs.....	130
Figura 2.5b Inibição do J6/JFH-1 em células tratadas com DsiRNAs pós-infecção.....	130
Figura 2.6a Ensaio de formação de colônias de células tratadas com DsiRNA.....	131
Figura 2.6b Densitometria das placas do ensaio de formação de colônias.....	131
Figura 3.1 Expressão de GFP em células transfectadas com plasmídeos para vetores lentivirais.....	148
Figura 3.2 Expressão de GFP em células infectadas com vetores lentivirais.....	148
Figura 3.3 Prancha de imunofluorescência do SGR-JFH-1 infectado com vetor lentiviral.....	149
Figura 3.4 Níveis de inibição do SGR-JFH-1 infectado por diferentes vetores lentivirais.....	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3' UTR	Região não traduzível 3'
5' UTR	Região não traduzível 5'
ALT	Alanina aminotransferase (<i>alanine transaminase</i>)
ARFP	Proteína de frame de leitura alternado (<i>alternative reading frame protein</i>)
CD4	Grupamento de diferenciação 4 (<i>cluster of differentiation 4</i>)
CD8	Grupamento de diferenciação 8 (<i>cluster of differentiation 8</i>)
CD81	Grupamento de diferenciação 81 (<i>cluster of differentiation 81</i>)
CDC	Centro de Controle de Doenças (<i>center for Disease Control</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>complementary DNA</i>)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dicarbonato de dietila (<i>diethylpyrocarbonate</i>)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido (dimethyl sulfoxide)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic Acid</i>)
DsiRNAs	siRNA substrato de Dicer (<i>dicer substrate siRNA</i>)
dsRBD	Domínio de ligação à dsRNA (<i>double strand RNA binding domain</i>)
dsRNA	RNA de fita dupla (<i>double strand RNA</i>)
E1	Glicoproteína de envelope 1
E2	Glicoproteína de envelope 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
eGFP	Proteína fluorescente verde aprimorada (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
eIF2b	Fator de iniciação eucariótico 2b (<i>eukaryotic Initiation Factor 2b</i>)
EM	Microscopia eletrônica (<i>electron microscopy</i>)
Exp5	Proteína Exportina-5 (<i>exportin-5</i>)
FEO	Gene <i>Firefly</i> + Gene de resistência à neomicina
GBVB	G. Barker vírus B
GLB	Tampão de lise Glasgow (<i>Glasgow Lysis Buffer</i>)
GTP	Guanosina trifosfato (<i>guanosine triphosphate</i>)

HAV	Vírus da hepatite A (<i>Hepatitis A virus</i>)
HBV	Vírus da hepatite B (<i>Hepatitis B virus</i>)
HCV	Vírus da hepatite C (<i>Hepatitis C virus</i>)
HCVcc	HCV derivado de cultura de células (<i>HCV cell culture</i>)
HCVpp	Pseudo-partícula de HCV (<i>HCV pseudo-particle</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>high-density lipoprotein</i>)
HDV	Vírus da hepatite D (<i>Hepatitis D virus</i>)
HEV	Vírus da hepatite E (<i>Hepatitis E virus</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
HRP	Peroxidase de raiz-forte (horseradish peroxidase)
HRV1	Região hipervariável 1 (<i>hypervariable region 1</i>)
hVAP-33	Proteína de adesão vascular humana (<i>human vascular adhesion protein 33</i>)
HVR2	Região hipervariável 2 (<i>hypervariable region 2</i>)
IFN	Interferon
IRES	Sítio de entrada ribossomal (<i>internal ribosome entry site</i>)
ISDR	Região determinante de sensibilidade ao interferon (<i>interferon sensitivity determining region</i>)
JFH-1	Hepatite fulminante japonesa 1 (<i>japanese fulminant hepatitis</i>)
LB	Caldo Luria (<i>Luria Broth</i>)
LCS	Região de baixa complexidade <i>Low complexity region</i>)
MAVS	Proteína mitocondrial de sinalização antiviral (<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MOI	Multiplicidade da infecção (<i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3 - (N-morfolino) Ácido propano sulfônico
mRNA	RNA mensageiro (<i>messenger RNA</i>)
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NANBH	Hepatite não-A não-B (<i>non-A non-B hepatitis</i>)
neoR	Gene de Resistencia a neomicina (<i>neomycin resistance</i>)
NK	Célula Assassina natural (<i>natural Killer cell</i>)
NKT	Célula assassina natural T (<i>natural Killer T cell</i>)

NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NPT	Neomicina fosfo-transferase (<i>neomycin phosphotransferase</i>)
NS	Não estrutural (<i>non-structural</i>)
NS2	Proteína não estrutural 2 (<i>non-structural protein 2</i>)
NS3	Proteína não estrutural 3 (<i>non-structural protein 3</i>)
NS4A	Proteína não estrutural 4A (<i>non-structural protein 4A</i>)
NS4B	Proteína não estrutural 4A (<i>non-structural protein 4B</i>)
NS5A	Proteína não estrutural 5A (<i>non-structural protein 5A</i>)
NS5B	Proteína não estrutural 5B (<i>non-structural protein 5B</i>)
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open read frame</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
PEG-IFN	Interferon peguilado (<i>pegylated interferon</i>)
PEI	Poli-etilenimina (<i>polyethylenimine</i>)
PLB	Tampão passivo de lise (<i>passive lysis buffer</i>)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (<i>polyvinylidene fluoride</i>)
RBV	Ribavirina
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	Interferência por RNA (<i>RNA interference</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SGR	Replicon subgenômico (<i>subgenomic replicon</i>)
SH3	Domínio de homologia à SRC (<i>SRC homology 3</i>)
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SR-BI	Receptor Scavenger classe B membro 1 (<i>scavenger receptor class B member 1</i>)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA (<i>tris-acetate-EDTA buffer</i>)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA (<i>tris-borate-EDTA buffer</i>)
TBS	Tampão salino (<i>tris-Buffered Saline</i>)
TEMED	N,N,N',N' tetramethylethylenediamine

TLR-3	Receptor tipo Toll 3 (<i>toll like receptor 3</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factors</i>)
VLDL	Lipoproteína de baixíssima densidade (<i>very low density lipoproteins</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVOS GERAIS	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. HEPATITES VIRAIS	24
3.2. VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)	25
3.2.1. DESCOBERTA DO HCV	25
3.2.2. EPIDEMIOLOGIA DO HCV	26
3.2.3. TRANSMISSÃO DO HCV	26
3.2.4. INFECÇÃO AGUDA	27
3.2.5. INFECÇÃO CRÔNICA	29
3.2.6. PATOLOGIA DA DOENÇA	29
3.2.7. RESPOSTA IMUNE AO HCV	30
3.2.8. TRATAMENTO À INFECÇÃO PELO HCV	31
3.2.9. BIOLOGIA MOLECULAR DO HCV	33
3.2.9.1. Classificação	33
3.2.9.2. Heterogeneidade genética	33
3.2.9.3. Organização do genoma	34
3.2.10. MODELOS DE ESTUDO DO HCV	36
3.2.10.1. Chimpanzés	36
3.2.10.2. Modelos animais não-primatas	36
3.2.10.3. Replicons	38
3.2.10.4. Infecção por pseudopartículas	39
3.2.10.5. Sistemas de cultura infecciosos	39
3.2.11. CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS	40
3.2.11.1. Ligação do vírus à célula hospedeira	40
3.2.11.2. Entrada e Liberação	42
3.2.11.3. Replicação do genoma	43
3.2.11.4. Montagem e liberação	43
3.2.11.5. Regiões não traduzíveis	44
3.2.11.6. Proteínas estruturais	47

3.2.11.7. Proteínas não estruturais	51
3.3. RNA DE INTERFERÊNCIA	58
3.3.1. IDENTIFICAÇÃO DA VIA	58
3.3.2. MECANISMO DE AÇÃO	59
3.3.3. MOLÉCULAS EFETORAS	61
3.3.3.1. shRNA	61
3.3.3.2. siRNA	62
3.3.3.3. DsiRNA	63
3.3.4. HCV x RNAi	63
4. MATERIAL E MÉTODOS	90
<hr/>	
4.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	90
4.1.1. LINHAGENS BACTERIANAS	90
4.1.2. PLASMÍDEOS E VETORES DE EXPRESSÃO	90
4.2. ANTICORPOS	92
4.3. MANIPULAÇÃO DE DNA	92
4.3.1. SEQUÊNCIA PADRÃO DO HCV	92
4.3.2. PRIMERS	93
4.3.3. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR	93
4.3.4. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	93
4.3.5. PCR DE COLÔNIA	94
4.3.6. PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR	94
4.3.7. DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO	95
4.3.8. ELETROFORESE DE GEL DE AGAROSE	95
4.3.9. PURIFICAÇÃO DE DNA EM GEL DE ACRILAMIDA	95
4.3.10. PRECIPITAÇÃO COM ETANOL	96
4.3.11. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	96
4.3.12. SEQUENCIAMENTO	97
4.3.13. ANELAMENTO DE PRIMERS	97
4.3.14. SISTEMA GATEWAY	98
4.4. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DE CULTURA DE BACTÉRIAS	98
4.4.1. BACTÉRIAS Z COMPETENTES (QUIMIOCOMPETENTES)	98
4.4.2. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES	99
4.4.3. CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS	99
4.4.4. ESTOQUE DE BACTÉRIAS	99
4.4.5. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM BAIXA ESCALA (MINIPREP)	100
4.4.6. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM LARGA ESCALA (MAXIPREP)	100
4.4.7. QUANTIFICAÇÃO DO DNA	101
4.5. MANIPULAÇÃO DE RNA	101
4.5.1. ÁGUA E PBS LIVRE DE RNASE	101
4.5.2. DsiRNA	101
4.5.3. PREPARAÇÃO DA FITA DE DNA	101

4.5.4.	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> DO RNA	102
4.5.5.	ELETOFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA RNA	102
4.6.	TÉCNICAS DE CULTURA DE CÉLULAS	103
4.6.1.	PASSAGEM DE ROTINA	103
4.6.2.	CONGELAMENTO DE CÉLULAS EUCARIÓTICA	103
4.6.3.	ELETROPORAÇÃO DE RNA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	104
4.6.4.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)	105
4.6.5.	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS	105
4.6.6.	ENSAIO DE LUCIFERASE	106
4.6.7.	LINHAGENS ESTÁVEIS DE CÉLULAS	107
4.7.	ESTUDO DE PROTEÍNAS	107
4.7.1.	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	107
4.7.2.	ENSAIO DE BCA	108
4.7.3.	SDS-PAGE	108
4.7.4.	WESTERN BLOT	109
4.7.5.	STRIPPING DE MEMBRANA DE NITROCELULOSE	110
4.7.6.	IMUNOFLUORESCÊNCIA	110
4.8.	ESTUDO COM VÍRUS COMPLETO	110
4.8.1.	ENSAIO COM VÍRUS COMPLETO	110
4.8.2.	TITULAÇÃO VIRAL	111
4.8.3.	TESTE DE INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DE HCVCC COM DsiRNAs	112
4.9.	PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS LENTIVIRAIS	112
4.9.1.	TRANSFEÇÃO DO VETOR VIRAL NAS CÉLULAS DE EMPACOTAMENTO	112
4.9.2.	TITULAÇÃO	112
4.9.3.	TESTE DE INIBIÇÃO EM REPLICON SUB-GENÔMICO	113
5.	ARTIGO I	116
5.1.	INTRODUCTION	117
5.2.	MATERIALS AND METHODS	118
5.3.	RESULTS	122
5.4.	DISCUSSION	124
5.5.	CONCLUSIONS	127
6.	ARTIGO II	136
6.1.	INTRODUÇÃO	137
6.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	139
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	142
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	154

Capítulo I

1. Introdução

A Hepatite C é a inflamação do fígado causada pela infecção pelo vírus da hepatite C (HCV). Essa inflamação ocorre na maioria das pessoas que adquire o vírus e, dependendo da intensidade e tempo de duração, pode levar à cirrose e câncer do fígado. Ao contrário dos demais vírus que causam hepatite, o vírus da hepatite C não gera uma resposta imunológica adequada no organismo, o que faz com que a infecção aguda seja menos sintomática, mas também com que a maioria das pessoas que se infectam se tornem portadores de hepatite crônica, com suas consequências a longo prazo.

No momento, estima-se que aproximadamente 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas por este vírus, evidenciando sua importância como um problema de saúde global. No Brasil, a prevalência é de aproximadamente 2-2,5% mas varia de acordo com a região estudada. O genótipo mais comum é o 1, seguido pelos genótipos 3 e 2.

A medicação padrão contra estes vírus consiste na administração de interferon- α e ribavirina, porém dependendo do genótipo esta terapia é efetiva somente para 50-60% dos indivíduos infectados e está associada a graves efeitos colaterais. Além disso, a resposta adaptativa do vírus é rápida em relação a pressão causada pela terapia antiviral. Portanto é necessário o desenvolvimento de drogas antivirais que bloqueiem eficientemente a produção e desenvolvimento do vírus.

O RNA de interferência (RNAi) é um processo celular que induz o silenciamento gênico. No reino vegetal, este mecanismo constitui o principal artifício de defesa contra patógenos intracelulares, contudo já foi demonstrado seu funcionamento em leveduras, invertebrados e vertebrados. Devido à alta eficiência e especificidade no desligamento de genes, esta metodologia vem sendo testada para ser utilizada na terapia de diversas doenças infecciosas, genéticas e autoimunes.

Já foi demonstrado que o HCV pode ser fortemente inibido por siRNAs em cultura de células utilizando modelos subgenômico e utilizando-se partículas virais derivadas de cultura de células. Entretanto, como já demonstrado na terapia com drogas convencionais, o tratamento com siRNAs permite a seleção de mutantes resistentes ao tratamento com estas moléculas ao longo do tempo. Ainda, a utilização de altas concentrações de moléculas de siRNAs pode levar a um desarranjo da via de RNAi (efeito off-target) no qual é possível observar inibição de genes de forma não específica. Também, sabe-se que

moléculas de siRNA são rapidamente degradadas por endonucleases presentes no soro e pelo processamento renal e portanto sua biodisponibilidade é baixa. Por fim o fígado, principal alvo da HCV, é um órgão de acesso relativamente complicado e a aplicação tópica dos siRNAs não é viável.

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de moléculas de RNAi que sejam capazes de inibir a replicação viral e que ao mesmo tempo não permitam a seleção de mutantes resistentes ao tratamento. Ainda foi testada uma metodologia de entrega de shRNAs baseado em um sistema lentiviral, que pode oferecer uma maior proteção e direcionamento das moléculas de RNAi.

Capítulo II

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Desenvolver moléculas de RNAi direcionadas para diferentes regiões conservadas do genoma do HCV e analisá-las *in vitro* quanto sua eficiência na inibição da replicação do vírus.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia das moléculas de RNAi quanto a inibição da replicação do vírus a curto e longo prazo.
- Verificar a seleção de variantes resistentes do vírus após o tratamento com moléculas de RNAi
- Construir e testar vetores lentivirais como metodologia alternativa de entrega das moléculas de RNAi em células alvo

Capítulo III

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Hepatites virais

Hepatite é uma patologia caracterizada pela inflamação do segundo maior órgão do corpo humano, o fígado. Esta inflamação pode estar relacionada a diversos fatores. Dentre estes, consumo crônico de medicamentos, utilização de drogas e álcool, doenças autoimunes, distúrbios metabólicos e principalmente a infecção por vírus, denominadas hepatites virais. Diversos vírus possuem tropismo por células hepáticas e principalmente cinco são capazes de infectar estas células: vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite D (HDV) e vírus da hepatite E (HEV).

Apesar da nomenclatura semelhante, estes vírus são distintos geneticamente pertencem à diferentes famílias virais sendo a única ligação entre eles o tropismo por células hepáticas e a capacidade de causar infecção nestas. O HAV é um patógeno transmitido pela via fecal-oral e pode ser transmitido por água e alimentos contaminados. Este vírus possui uma vírion não envelopado, com RNA de fita positiva e foi classificado na família *Picornaviridae* e gênero *Hepacivirus* (MARTIN; LEMON, 2006). O HAV é endêmico principalmente em países menos desenvolvidos e o tratamento é caracterizado por terapia de suporte. Estão disponíveis no mercado duas vacinas com boa eficiência (HOLLINGER; EMERSON, 2001; ARGUEDAS; FALLON, 2004). O HBV é um vírus de evolução lenta que infecta principalmente humanos e alguns primatas, sendo transmitido exclusivamente pela via parenteral, por meio de sangue e fluidos corporais contaminados (LEE, 1997). A infecção aguda é caracterizada por sintomas brandos, dentre estes, inflamação no fígado, vômitos e icterícia e, raramente morte. Entretanto, em 1% dos casos pode ocorrer uma progressão da infecção para hepatite fulminante e aproximadamente 25% dos casos evoluem para infecção crônica (GANEM; PRINCE, 2004). Em quadros crônicos o desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular são reportados. Diversas vacinas estão disponíveis no mercado com boa eficiência na proteção dos indivíduos vacinados (ALTER, 2012).

O vírus da hepatite D é considerado um vírus incompleto, já que necessita da presença do vírus da hepatite B para completar sua replicação (RIZZETTO et al., 1977). Este vírus é transmitido por meio da via percutânea ou contato mucosal com sangue

infectado. Possui RNA de fita simples de polaridade negativa e, devido à sua característica singular não está classificado em nenhuma família viral e é membro único do gênero *Deltavirus*. Não são conhecidas vacinas para o HDV, entretanto a sua prevenção pode ser feita pela vacinação de pessoas ainda não infectadas pelo HBV (WEDEMEYER; MANNS, 2010). O HEV é outro vírus transmitido pela via fecal-oral e faz parte da família *Hepeviridae* e gênero *Hepevirus*. A sintomatologia da infecção por este vírus é bastante semelhante à causada pelo HAV, na maioria dos casos ocorre cura espontânea e casos crônicos são bastante raros. Não existem vacinas para prevenção e o tratamento, assim como para o HAV é de suporte (MUSHAHWAR, 2008).

3.2. Vírus da hepatite C (HCV)

3.2.1. Descoberta do HCV

Entre as décadas de 60 e 70 foram desenvolvidos testes específicos para identificar o vírus da hepatite B (1963) e o vírus da hepatite A (1973) em pacientes que sofriam da doença da “pós-transfusão” – síndrome hepática que acometia pacientes após a transfusão de sangue. Entretanto, em grande parte dos casos, os testes eram negativos para a presença destes dois vírus, mesmo o paciente apresentando toda a sintomatologia característica da síndrome (PURCELL; ALTER; DIENSTAG, 1976). Naquele momento alguns cientistas determinaram que havia algum outro patógeno causando aqueles sintomas, e este patógeno desconhecido ganhou o nome de hepatite não A e não B (NANBH) (REALDI et al., 1982). Os quadros agudos da NANBH eram mais brandos que os da HBV apesar de quadros crônicos serem mais frequentes (FEINSTONE; PURCELL, 1978). Foi demonstrado que o agente infeccioso era sensível ao clorofórmio, indicando que possuía provavelmente um envelope lipídico (BRADLEY et al., 1983; FEINSTONE et al., 1983) e ainda experimentos de filtração demonstraram que o patógeno possuía um tamanho aproximado de 30-60 nm (HE et al., 1987).

Ao fim da década de 80 um grupo de pesquisadores do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, utilizando, naquele momento, ferramentas inovadoras de clonagem conseguiram identificar pela primeira vez o patógeno responsável pelas NANBH. A estratégia utilizada pelos pesquisadores consistiu na extração do RNA do soro de chimpanzés infectados com NANBH e este foi

reversamente transcrito e clonado em plasmídeos para formar uma biblioteca de cDNA. As proteínas expressas por esta biblioteca foram testadas contra o soro de pacientes que apresentavam NANBH e altos níveis de ALT – indicativo de dano hepático. Foi identificado um clone positivo e estudos de hibridização demonstraram que este clone era capaz de se ligar à uma molécula de RNA de fita simples, com 10 mil nucleotídeos de extensão. Análises nucleotídicas deste RNA demonstraram que o mesmo possuía um sítio aberto de leitura (ORF) e que o antígeno produzido por este material genético era capaz de se ligar ao soro de pacientes NANBH. Finalmente, este novo agente foi denominado vírus da hepatite C (CHOO et al., 1989). Atualmente acredita-se que 95% dos casos denominados como NANBH eram quadros de infecção por HCV.

3.2.2. Epidemiologia do HCV

Estima-se que aproximadamente 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV), evidenciando sua importância como um problema de saúde global (LAVANCHY, 2011) (Figura 1). Em 2012, nos Estados Unidos, o número de fatalidades relacionadas ao HCV superou pela primeira vez as casualidades correlatas ao HIV (LY et al., 2012). No Brasil, a estimativa de prevalência é de 1.5% a 1.7% para a população em geral e doadores de sangue (LYRA; FAN; DI BISCEGLIE, 2004), e nas diferentes regiões brasileiras as prevalências são: 0,9 a 2,4% no Norte, 1,7 a 3,4% no Nordeste, 1,0 a 1,4% no Centro-Oeste, 0,8 a 2,8% no Sudeste e 1,1 a 2,1% no Sul (CAMPIOTTO et al., 2005). Entretanto, como a infecção aguda e, na maioria das vezes, a infecção crônica são assintomáticas, é difícil de se estimar o número real de pacientes infectados e acredita-se que o número de indivíduos que possuem o vírus possa ser significativamente maior (LAVANCHY, 2009). Com a identificação do vírus em 1989 e com o início da testes de detecção de HCV nos bancos de sangue o número de novas contaminações por sangue contaminado diminuiu. Por outro lado, a quantidade de usuários de drogas injetáveis está aumentando o que pode ser um fator ainda negligenciado de disseminação do vírus (WISE et al., 2008).

3.2.3. Transmissão do HCV

A transmissão do vírus ocorre após o contato com sangue contaminado por meio de utilização de droga injetáveis, tatuagem e utilização de instrumentos cirúrgicos não

esterilizados. Até a identificação do HCV em 1989, a via de infecção mais comum era através de transfusões sanguíneas com sangue infectado pelo vírus (BUSCH; SHAFER, 2005). Atualmente a vias de infecção mais comum é o compartilhamento de seringas por usuários de drogas injetáveis (SOZA; RIQUELME; ARRESE, 2010). A transmissão sexual é possível mas extremamente rara (CLARKE; KULASEGARAM, 2006). A transmissão vertical também é pouco comum, entretanto, as chances aumentam bastante caso a carga viral paciente da gestante sejam maior que 10^6 genomas virais/ mL (THOMAS et al., 1998). Existe uma chance de aproximadamente 7% da transmissão do HCV durante a gestação, contudo, essa probabilidade pode aumentar em até cinco vezes caso a gestante esteja co-infectada com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CLARKE; KULASEGARAM, 2006).

3.2.4. Infecção Aguda

A infecção aguda por HCV é assintomática na maioria dos pacientes; a história natural e taxas de cronificação variam de acordo com a população estudada. Os sintomas, quando presentes são caracterizados por fadiga, mialgia, febre baixa, dor moderada no quadrante superior, náusea e/ou vômito (MAHESHWARI; RAY; THULUVATH, 2008). A hepatite aguda pode se manifestar de 2 a 12 semanas após a exposição inicial (média de 7 semanas) e durar de 2 à 12 semanas (MARCELLIN, 1999). Os quadros de hepatite aguda podem ser graves e prolongados mas, raramente são fulminantes. Estudos sugerem que pacientes que desenvolvem icterícia tendem a ter uma melhor taxa de cura espontânea em relação à aqueles com infecção assintomática (VILLANO et al., 1999; GERLACH et al., 2003). A presença de icterícia pode ser um indicador de uma resposta imune efetiva que leva à uma eliminação viral espontânea.

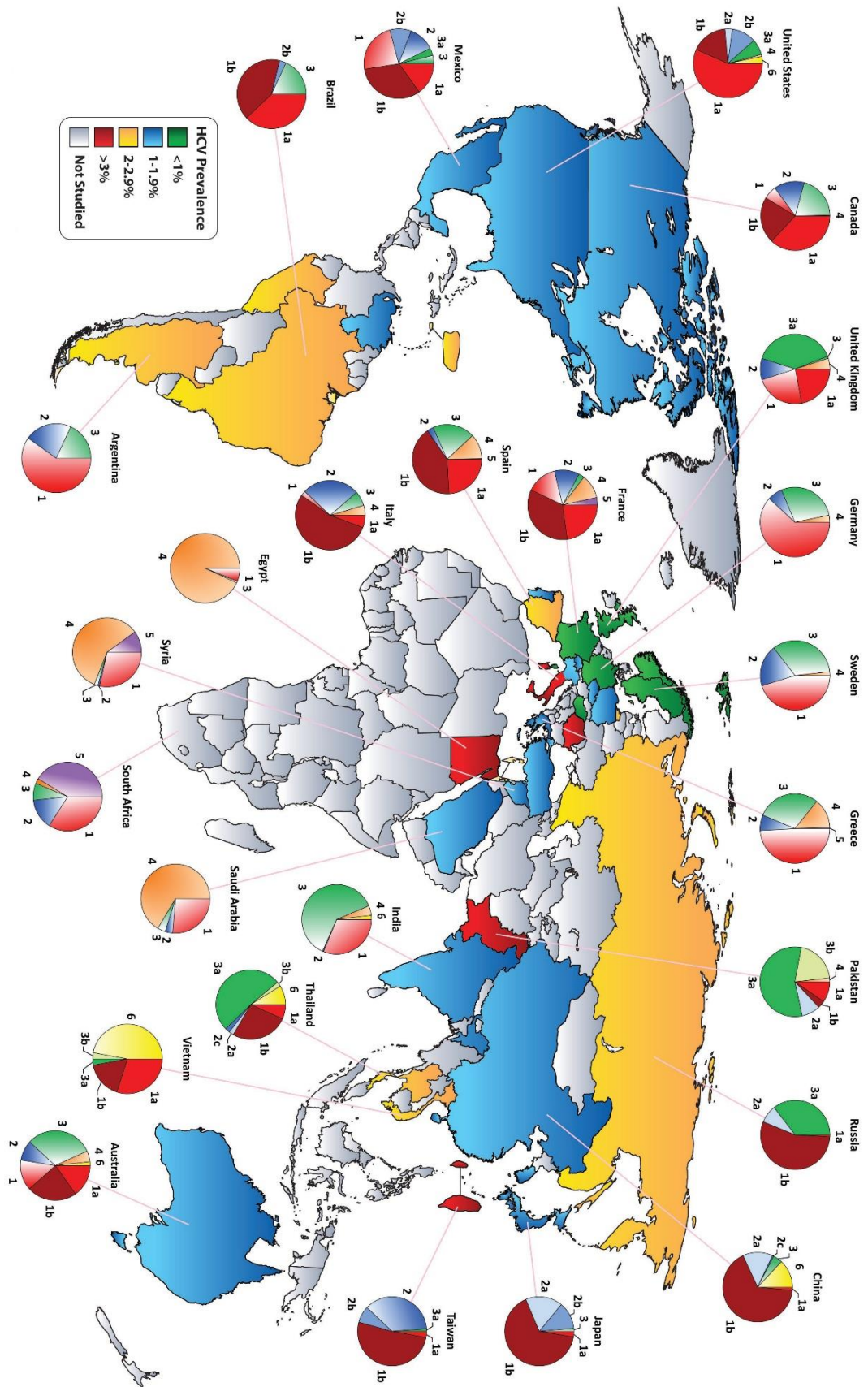


Figura 1. Prevalência de infecção pelo HCV no mundo. A prevalência no Brasil é de aproximadamente 2,9% sendo o genótipo 1 responsável por grande parte das infecções. (NEGRO; ALBERTI, 2011)

Outros fatores que podem colaborar com uma cura espontânea incluem a infecção ocorrer com um vírus do genótipo 3 (LEHMANN et al., 2004); paciente do sexo feminino (Gerlach et al., 2003); baixa carga viral; ser branco como origem étnica (VILLANO et al., 1999) e um rápido declínio da carga viral nas primeiras quatro semanas após o diagnóstico. Por outro lado, indivíduos negros e/ou co-infectados com HIV (THOMAS et al., 2000) são fatores de risco para a persistência viral.

3.2.5. Infecção Crônica

A persistência viral, ou infecção crônica é caracterizada pela detecção do RNA do HCV seis meses após a data presumida da infecção inicial e normalmente é assintomática (MAHESHWARI; RAY; THULUVATH, 2008). O mecanismo de persistência viral é multifatorial e o HCV desenvolveu diversas estratégias para evadir-se do sistema imune e persistir. A alta variabilidade genética do vírus permite que este evada ao sistema imune de forma passiva. Além disto algumas proteínas virais interagem com genes celulares envolvidos na resposta imune, proliferação celular ou causam apoptose. Ainda, além dos hepatócitos, o vírus é capaz de infectar e se replicar (SARHAN et al., 2012) em células B (DUCOULOMBIER et al., 2004) e T (LASKUS et al., 2000) e conseqüentemente a infecção destas células pode alterar a função das mesmas dificultando a resposta imune (PAVIO; LAI, 2003). Acredita-se que cerca de 80% dos casos de hepatite aguda se tornem crônicos (HOOFNAGLE, 2002) e, assim como a fase aguda, em um primeiro momento também são assintomáticos ou apresentam sintomas muito inespecíficos como letargia, dores musculares e articulares, cansaço, náuseas e síndrome gripal. Em fase avançada pode evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (RUSTGI, 2007). A mortalidade relacionada ao HCV é uma conseqüência de cirrose hepática e o desenvolvimento do HCC (CHEN; MORGAN, 2006).

3.2.6. Patologia da Doença

O processo de inflamação do fígado devido a infecção viral aparentemente é conseqüência do reconhecimento e destruição de hepatócitos infectados pelo sistema imune (GONZALEZ-PERALTA; DAVIS; LAU, 1994) já que o vírus da hepatite C não é diretamente citopático. Infecções persistentes do HCV no fígado constantemente ativam

uma resposta por células T, o que provavelmente é o principal mecanismo de lesão hepática. Células T citotóxicas capazes de reconhecer proteínas estruturais e não estruturais do HCV (especialmente CORE e NS4) foram identificadas em infiltrados do fígado (MINUTELLO et al., 1993) e acredita-se que a resposta predominante de Th1 pode desempenhar um papel nas lesões necro-inflamatórias do fígado (GONZALEZ-PERALTA; DAVIS; LAU, 1994; NAPOLI et al., 1996). Este processo necro-inflamatório constante, ineficaz para a eliminação do vírus, é provavelmente a principal causa dos mecanismos de fibrogênese, responsáveis pela progressão da doença hepática.

Os hepatócitos são o principal tipo celular encontrado no fígado, estas células estão envolvidas na síntese de proteínas, colesterol, bile e fosfolípidios. Células estreladas também estão presente no órgão e são ativadas por células do tipo Kupffer em resposta à infecção pelo HCV. Células estreladas ativadas produzem colágeno, preteoglicanos e glicoproteínas adesivas, causando fibrose. O processo fibrótico à longo prazo, leva a mudanças irreversíveis na estrutura do fígado, levando ao quadro de cirrose. Sintomas como náusea, dor abdominal e icterícia podem se manifestar em pacientes com casos avançados de cirrose hepática (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002; ASSELAH; BENHAMOU; MARCELLIN, 2009).

A patogênese do HCC causada pelo HCV ainda não é completamente conhecida. Acredita-se que várias interações de proteínas virais-celulares podem exercer um papel direto no desenvolvimento do HCC. Perturbações do ciclo celular, combinadas com um aumento na expressão de oncogenes e perda de função dos genes supressores de tumor causados pela infecção viral podem ser a chave para o desenvolvimento do HCC (HUANG et al., 2011).

3.2.7. Resposta imune ao HCV

A imunidade inata e adaptativa desempenham um papel importante na infecção viral. No fígado, células NK (*natural killer*), células NKT (T natural killer), células de kupfer e liberação de interferon por células infectadas são responsáveis pela resposta imune inata. As células NK e NKT são responsáveis pela lise citotóxica das células infectadas por meio da liberação de grânulos de perforina e proteases (granenzimas). Estas células também produzem grandes quantidades de interferon tipo II e TNF alpha

(ASHFAQ et al., 2011). A produção de fitas dupla de RNA durante o ciclo replicativo do HCV é responsável pela ativação da via de interferon tipo I. As células hospedeiras reconhecem o RNA de fita dupla por meio do receptor tipo Toll 3 (TLR-3) (ALEXOPOULOU et al., 2001). A ativação de interferon tipo I e interferon β , desempenham um importante papel no sistema de defesa precoce à infecção viral. Estudos demonstraram que camundongos deficientes em interferon e interferon β falharam na eliminação da infecção por HCV (MULLER et al., 1994). Humanos com defeitos genéticos no gene STAT-1, que está envolvido na cascata de sinalização da via do interferon não sobrevivem à infecções virais (DUPUIS et al., 2003). Por fim, células NK desempenham um papel importante e podem eliminar o vírus sem a indução de resposta de qualquer célula T HCV específica em chimpanzés (CHEENT; KHAKOO, 2011).

A resposta imune adaptativa consiste em um processo humoral, como a produção de anticorpos por células B e processo celular como a sensibilização de células T auxiliar CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos CD8⁺. Anticorpos vírus-específicos são usualmente detectados aproximadamente de 7-8 semanas após a infecção pelo HCV (PAWLOTSKY et al., 1995). Ainda não é completamente conhecido se estes anticorpos são capazes ou não da neutralização da infectividade das partículas virais. Infecções virais *in vitro* podem ser neutralizadas a partir do tratamento com anticorpos produzidos *ex-vivo* (FARCI et al., 1994) porém, utilizando-se anticorpos produzidos naturalmente a neutralização é ineficiente para humanos e chimpanzés. Células T auxiliares CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados via sinalizadores MHC tipo II presentes na superfície de células profissionais apresentadoras de antígenos. Por outro lado, células T citotóxicas CD8⁺ reconhecem antígenos apresentados via MHC tipo I presentes em células do hospedeiro infectadas. Células CD8⁺ desempenham um papel diferenciado, como a destruição de células infectadas e secreção de citocinas como IFN gamma e TNF, que podem inibir a replicação viral sem levar a morte celular (GUIDOTTI; CHISARI, 2001).

3.2.8. Tratamento à infecção pelo HCV

A infecção por HCV raramente é diagnosticada durante a fase aguda e portanto, o tratamento da hepatite aguda é bastante limitado. Porém, estudo recente demonstrou que o tratamento precoce da infecção com interferon pode ser benéfico (GUPTA; SINGH, 2012). Todos pacientes com infecção crônica são candidatos à terapia. No passado o tratamento padrão consistia na administração de interferon (IFN) isoladamente ou em

combinação com a ribavirina. O IFN é uma citocina que desempenha um papel importante na resposta imune inata à vírus. O mecanismo molecular para o qual o IFN atua é mediado por meio da sua ligação à receptores de superfície de células alvo, esta ligação leva à uma cascata de fosforilação envolvendo diferentes tirosino-quinases. Por fim, fatores de transcrição são recrutados ao núcleo, onde induzem a síntese de diversos fatores antivirais (HOFMANN; ZEUZEM; SARRAZIN, 2005). A utilização de interferon alpha (IFN- α) isoladamente resulta em uma resposta virológica sustentada de 16-20% após 12 meses de tratamento (DI BISCEGLIE; HOOFNAGLE, 2002). A ribavirina é um análogo de guanidina com amplo espectro antiviral, que melhora a resposta do paciente ao tratamento com interferon. O efeito antiviral da ribavirina é originado por meio da modulação da via de sinalização do IFN e inibição da inosina monofosfato desidrogenase, que resulta na diminuição de GTP. A ribavirina ainda possui um efeito direto na RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e mutagênese, o que resulta em uma redução na infectividade viral (FELD; HOOFNAGLE, 2005). A combinação de interferon e ribavirina resulta em uma resposta viral sustentada de 35-40% dos pacientes (POYNARD et al., 1998).

Desde 2001, a utilização de IFN- α 2a ou IFN- α 2b peguilado substituíram a utilização do interferon recombinante. O tratamento atual para hepatite C consiste em uma combinação de interferon α peguilado (PEG-IFN) com ribavirina (RBV). Essa combinação é eficiente em pacientes infectados com o HCV genótipos 2 e 3, com índice de resposta viral sustentada de 75-90%. Entretanto essa combinação é menos eficiente para indivíduos infectados pelo vírus genótipos 1 e 4, com respostas sustentadas de 45% e 52% respectivamente (DEUTSCH; HADZIYANNIS, 2008). O PEG-IFN possui uma meia vida maior comparada ao IFN- α não modificado e portanto pode ser administrado apenas uma vez por semana. Existem comercialmente duas isoformas de PEG-IFN utilizadas no tratamento de infecção crônica por HCV, pegIFN- α 2a (Pegassays – administrado na dose de 180 μ g/semana) e pegIFN- α 2b (PegIntron, dosagem de 1.5 μ g/kg por semana). A meia vida do Pegasys é de 60-80 h, já a do PegIntron é menor, 40 horas. Apesar das diferenças na meia-vida, ambas as drogas são injetadas apenas uma vez por semana (ASHFAQ et al., 2011). Apesar da relativa eficácia da combinação PEG-IFN e ribavirina (RBV), ainda é difícil tratar pacientes co-infectados com o HIV ou HBV, alta viremia, genótipos 1 e 4, não respondedores à monoterapia e pacientes com transplante de órgãos sólidos (DHIMAN; CHAWLA, 2005).

Atualmente novos fármacos estão em desenvolvimento, dentre estes, a classe dos antivirais que atuam especificamente contra a serino-protease viral. Pacientes

previamente resistentes ao tratamento tradicional, quando retratados com Telaprevir obtiveram uma taxa de resposta viral sustentada superior a aqueles retratados somente com INF- α e RBV (MCHUTCHISON et al., 2010). No momento, o Telaprevir constitui na única droga a ser administrada em casos de resistência ao tratamento convencional (PEARLMAN, 2012). Entretanto, sabe-se que cerca de 20% dos pacientes se tornam resistentes a esse fármaco 48 h após a sua administração inicial, impossibilitando que estes obtenham uma resposta viral sustentada (MCHUTCHISON et al., 2009).

3.2.9. Biologia molecular do HCV

3.2.9.1. Classificação

O vírus da hepatite C é um membro da família *Flaviviridae* que também incluem o vírus da dengue e da febre amarela. A família *Flaviviridae* consiste de três gêneros: *Pestivirus* (causadores de infecções em bovinos e suínos), *Flavivirus* (causadores, dentre outros, da febre amarela) e *Hepacivirus* (onde o HCV está incluído). Um quarto gênero está sendo estudado para ser incluído na família *Flaviviridae*, denominado *Pegivirus*, dentro deste novo gênero estariam incluídos os vírus GBV-A, GBV-B e GBV-C (único presente em humanos) (STAPLETON et al., 2011). Até recentemente o HCV era considerado o único membro do gênero *Hepacivirus* entretanto, um novo membro do gênero foi identificado em cães (KAPOOR et al., 2011). Além disto, acredita-se que também possa haver um outro membro do gênero, que possui como hospedeiro equinos (BURBELO et al., 2012).

3.2.9.2. Heterogeneidade genética

A comparação de sequências nucleotídicas de variantes de HCV obtidas de diferentes indivíduos, em regiões geográficas diversas, demonstrou a existência de pelo menos sete grupos geneticamente distintos (genótipos 1 a 7) (KUIKEN; SIMMONDS, 2009). Considerando o genoma completo, os sete grupos diferem entre 30-35% entre os sequencia nucleotídica, com maior variabilidade em alguns genes como E1 e E2, e sequências mais conservadas no Core e codificantes da proteína não estrutural NS3. A região de menor variabilidade no genoma do HCV é encontrada na região 5' UTR (DI

BISCEGLIE; HOOFNAGLE, 2002). Cada um dos sete genótipos 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, os Genótipos 1, 2 e 3 são os mais frequentes, com predominância do genótipo 1 na maioria dos estados (KERSHENOBICH et al., 2011). O genótipo específico pelo qual o paciente está infectado tem um papel importante na progressão da doença e na resposta ao tratamento (HADZIYANNIS; KOSKINAS, 2004).

A grande divergência de sequência do HCV se deve aos altos níveis de replicação do vírus e a baixa fidelidade da RNA polimerase dependente de RNA codificada pelo vírus. Esta baixa fidelidade da enzima leva a uma taxa de mutação de aproximadamente 10^{-4} mudanças de nucleotídeo por sítio ao ano (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000). Em um mesmo indivíduo infectado estão presentes diferentes subtipos virais, denominados quasiespécies. Estas quasiespécies variam geneticamente 1-5% em relação ao conteúdo nucleotídico (HONDA et al., 1994; DAVIS, 1999) e geralmente ocorre o domínio de uma destes subtipos virais, que podem se alternar de ano para ano. A região hipervariável I (HVR1), localizado na porção N terminal da proteína estrutural E2 é onde se encontra grande parte das mutações não-sinônimas, observação consistente com a pressão seletiva do hospedeiro durante uma infecção persistente (WANG et al., 2007). Portanto, acredita-se que as quasiespécies podem desempenhar um papel no escape viral do sistema imune e desempenhar um papel na progressão da doença.

3.2.9.3. Organização do genoma

O vírus da hepatite C possui ácido nucléico do tipo RNA de fita simples, polaridade positiva com aproximadamente 9,6 kb de extensão (CHOO et al., 1989). O genoma é constituído de apenas um *open reading frame* (ORF) que codifica uma única poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais para formar 10 proteínas virais funcionais (GRAKOU, WYCHOWSKI; et al., 1993; LIN et al., 1994) (Figura 2). As proteínas estruturais incluem, o core, glicoproteínas do envelope E1 e E2, e p7. Dentre as proteínas não

estruturais (NS), estão incluídas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. As proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação do genoma viral e assume-se que desempenham diversos papéis na montagem e na secreção das partículas virais. A proteína p7 é codificada entre as proteínas estruturais e não estruturais e a sua presença nos vírions ainda não foi confirmada.

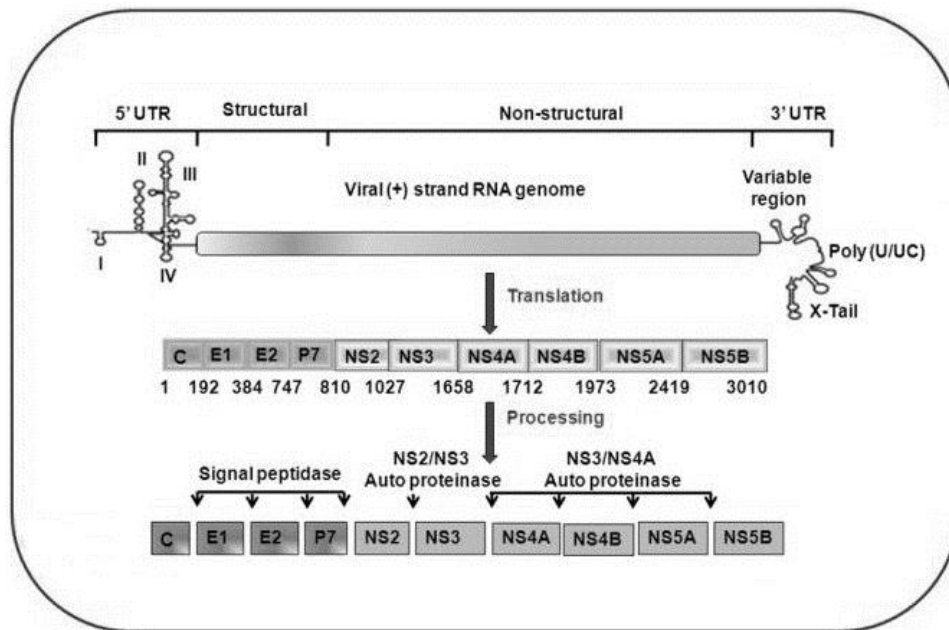


Figura 2. Organização do genoma do HCV. A região traduzível é flanqueada por duas regiões não-traduzíveis de grande importância para replicação viral. A tradução do RNA viral da origem à uma poliproteína pós-traducionalmente clivada por proteases virais.

A tradução é realizada por um mecanismo independente de CAP onde a unidade ribossomal 40S é recrutada, junto com outras proteínas celulares, para a região altamente organizada de estruturas de RNA na região 5' UTR que foram o sítio interno de entrada ribossomal (IRES) (TSUKIYAMA-KOHARA et al., 1992). As proteínas estruturais são liberadas por peptidases de sinal do hospedeiro (HIJIKATA et al., 1991; GRAKOU, MCCOURT; et al., 1993a) e as proteínas não estruturais por duas proteases virais: a cisteína auto-protease NS2 (GRAKOU, MCCOURT; et al., 1993b; LORENZ et al., 2006; SCHREGEL et al., 2009) NS2 que catalisa a clivagem na junção NS2/NS3 e a serino protease NS3/4A (TOMEI et al., 1993) que cliva e libera as outras proteínas não estruturais.

3.2.10. Modelos de estudo do HCV

3.2.10.1. Chimpanzés

Os chimpanzés são os únicos animais, além dos humanos, capazes de serem infectados com o HCV e a utilização destes animais permitiu a identificação que um agente infeccioso era responsável pelas hepatites NANB (ALTER et al., 1978; TABOR et al., 1978). Ainda, a partir da utilização destes animais foi possível o isolamento e clonagem do HCV pela primeira vez (CHOO et al., 1989) e a confirmação da infectividade das partículas virais derivadas de cultura de células produzidas a partir do isolado viral JFH-1 (WAKITA et al., 2005). Chimpanzés infectados com o isolado JFH-1 tornaram-se positivos para o RNA viral 3 dias após a infecção entretanto, os animais não apresentavam sinais de hepatite e a viremia era relativamente baixa (WAKITA et al., 2005; KATO et al., 2008).

Existem diferenças no curso da doença em humanos e chimpanzés, já que a doença é mais branda nos animais (BOONSTRA et al., 2009) e um estudo longitudinal demonstrou que as taxas de infecções crônicas eram muito menores em chimpanzés (33%) do que em humanos (80%) (BASSETT; BRASKY; LANFORD, 1998). Como o GB vírus B (GBVB) e o HCV possuem uma alta taxa de similaridade genética, acredita-se que a partir do estudo da infecção por ambos os vírus em modelos animais será possível identificar porque o primeiro vírus tem uma maior tendência à infecção aguda e o segundo à infecção crônica (BEAMES; CHAVEZ; LANFORD, 2001). Apesar dos estudos utilizando GBVB e saguis (gênero *Saguinus*) serem importantes para entender a biologia do HCV, chimpanzés ainda são utilizados atualmente para teste de drogas anti-HCV, vacinas (CARROLL et al., 2009; VERSTREPEN et al., 2011), análise de respostas imunes e persistência viral (KATO et al., 2008). As maiores desvantagens da utilização deste modelo são o alto custo, o baixo número de amostras/indivíduos, ausência de fibrose induzida pela infecção e problemas éticos.

3.2.10.2. Modelos animais não-primatas

Camundongos deficientes de células T e B, enxertados com hepatócitos humanos são os únicos animais de pequeno porte que podem ser infectados efetivamente pelo HCV

(MERCER et al., 2001; KNETEMAN et al., 2009). Devido a estes camundongos serem imunodeficientes, eles não podem ser utilizados em estudos de imunidade adaptativa. Com isto, estes animais vem sendo utilizado principalmente na pesquisa de infecção pelo HCV e patogênese (PLOSS; RICE, 2009; DE JONG; RICE; PLOSS, 2011). Apesar de algumas técnicas sofisticadas e originais terem sido utilizadas, esses modelos possuem restrita replicação do HCV e são capazes de mimetizar apenas parte do ciclo replicativo do HCV, limitando a eficiência destes modelos.

O primeiro estudo com roedores de pequeno porte iniciou-se em 2001 (MERCER et al., 2001) quando demonstrou-se que animais imunodeficientes, com uma alteração genética que levava uma degeneração de seus hepatócitos podiam ser enxertados com hepatócitos humanos e posteriormente infectados com HCV. Utilizando-se essa técnica, a repopulação do fígado do camundongo com hepatócitos humano era eficiente e era possível verificar índices de infectividade semelhante ao visto em humanos (STEENBERGEN et al., 2010), entretanto o principal problema desta técnica era a alta mortalidade dos modelos animais durante o processo de enxerto, que deve ser feito com hepatócitos humanos congelados nas primeiras duas semanas de vida do animal (MERCER et al., 2001). Também utilizando-se animais imunossuprimidos e alterações genéticas (ah-/-Rag2-/-IL2rg-/-[FRG]) foi possível criar um outro modelo animal, igualmente eficiente na repopulação do fígado do animais com hepatócitos humano (BISSIG et al., 2010). Neste modelo, até 95% das células do fígado do camundongo podem ser substituídas com células humanas que são susceptíveis a infecção pelo HCV.

Utilizando-se estes modelos, os animais quiméricos podem ser infectados com inoculo viral extraído de pacientes (MERCER et al., 2001; MEULEMAN et al., 2005; BISSIG et al., 2010) ou produzidos *in vitro* (HIRAGA et al., 2007; BISSIG et al., 2010). Eles também podem ser infectados por injeção intra-hepática de RNA de clones do HCV (KIMURA et al., 2008), permitindo a utilização de estudos de genética reversa. Após a infecção, os títulos de HCV aumentam rapidamente, chegando à aproximadamente $> 10^7$ IU/mL após duas semanas da infecção (HIRAGA et al., 2007; BISSIG et al., 2010). A composição das partículas de HCV produzidas em fígados quiméricos são semelhantes à aquelas encontradas em humanos ou chimpanzés infectados (LINDENBACH et al., 2006). Por fim, estudos de infecção a longo prazo (até 10 meses) também são possíveis (BISSIG et al., 2010) e a infecção com todos os seis genótipos já foi verificada (BUKH et al., 2010).

O maior problema destes modelos é a impossibilidade da utilização destes animais quiméricos em estudos de imunidade adaptativa ao HCV e por consequência não podem ser utilizados em estudos para o desenvolvimento de vacinas e/ou alguns aspectos patológicos do ciclo replicativo do vírus. Entretanto estudos utilizando estes modelos já demonstraram o seu valor no entendimento de neutralização vírus, interação vírus-receptor, novas terapias e resposta imune inata. Por fim, estes modelos vem sendo utilizado para a confirmação dos resultados obtidos no modelo *in vitro* com células Huh7 (BUKH, 2012)

3.2.10.3. Replicons

Uma ferramenta importante na facilitação dos estudos da replicação do RNA do HCV foi o desenvolvimento do replicon subgenômico (SGR). Os replicons eram inicialmente derivados do clone CON1, genótipo 1b, e, eram moléculas de RNA bicistrônicas que possuíam o gene da neomicina fosfotransferase (NPT) e os genes não estruturais requeridos para a replicação do RNA do HCV (NS3-NS5B) (SGR-Neo-Con1). A capacidade de replicação desta construção pode ser verificada pela seleção com geneticina de células de hepatoma humano (Huh7) que possuíam o replicon. Inicialmente o gene NS2 estava presente nesta construção subgenômica, entretanto foi verificado que ele não era essencial para a replicação do RNA (LOHMANN et al., 1999).

Foram observadas mutações na sequência original do SGR após a sua introdução nas células. Ao se introduzir essas mutações no replicon selvagem foi possível melhorar a replicação em 10^5 vezes (BLIGHT; KOLYKHALOV; RICE, 2000; KRIEGER; LOHMANN; BARTENSCHLAGER, 2001). O SGR mais comumente utilizado em laboratórios, denominado FK5.1 contém duas mutações na NS3, uma na NS4B e quatro na NS5A (KRIEGER; LOHMANN; BARTENSCHLAGER, 2001). A replicação dos SGR era inicialmente restrita a linhagem celular Huh7. O tratamento de células Huh7 que expressam estavelmente um replicon genótipo 1b com IFN- α levou a uma remoção do RNA do HCV das células. Posteriormente, verificou-se que estas células sem o replicon eram mais permissivas à replicação quando re-infectadas com o RNA do HCV e com isso passaram a ser denominadas Huh7.5 (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002). Por algumas vezes foi tentando a criação de replicons completos, contendo todos os genes virais, entretanto estas tentativas falharam devido à ausência de produção de partículas

infecciosas e baixa eficiência de replicação (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002; PIETSCHMANN et al., 2002). A substituição do gene de resistência pelo gene repórter, Firefly luciferase, criou um sistema de análise transiente (LOHMANN et al., 2001) que permitia a análise em larga escala de compostos antivirais.

3.2.10.4. Infecção por pseudopartículas

O desenvolvimento de pseudopartículas do HCV (HCVpp) melhorou a eficiência de estudos que verificavam o processo de entrada viral à célula hospedeira. As HCVpp são geradas conjugando as glicoproteínas do HCV E1 e E2 à proteína CORE de um retrovírus (vírus da leucemia murina). Isto pode ser feito por meio da co-transfecção de vetores de expressão contendo as glicoproteínas do HCV, proteínas retrovirais gag-pol e um componente de empacotamento contendo um gene repórter em uma linhagem celular produtora (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003a). Essa técnica facilitou estudos de entrada mediado por glicoproteínas e tem sido utilizado para demonstrar a entrada celular mediado por moléculas CD81 e SR-B1 (BARTOSCH et al., 2003) e que a liberação do genoma intracelular é pH dependente (HSU et al., 2003).

3.2.10.5. Sistemas de cultura infecciosos

Um grande avanço no estudo do HCV foi a identificação do isolado altamente infeccioso JFH-1 (*japanese fulminant hepatitis* – hepatite japonesa fulminante), que é capaz de produzir partículas virais infecciosas em cultura de células e chimpanzés (WAKITA et al., 2005; ZHONG et al., 2005). Análises posteriores revelaram que vírus quiméricos baseados no isolado JFH-1 eram capaz de causar infecção tanto em cultura celular quanto *in vivo* (LINDENBACH et al., 2006; PIETSCHMANN et al., 2006). A infectividade das partículas de HCV derivadas de cultura de células (HCVcc) podem ser neutralizadas com anticorpos contra E2 e CD81 e também com o soro de pacientes (WAKITA et al., 2005; YI et al., 2006).

Apesar da maioria dos clones atuais terem sido baseados em um contexto do isolado JFH-1, um clone também infeccioso, do genótipo 1a derivado do isolado H77 foi desenvolvido entretanto, este clone é menos infeccioso que o JFH-1 (YI et al., 2006).

Vírus quiméricos, envolvendo as proteínas estruturais de isolados não-2a podem necessitar de mutações compensatórias para uma melhor infectividade (YI et al., 2007).

A habilidade única do JFH-1 em replicar em cultura de células pode estar na alta eficiência de sua polimerase viral (SIMISTER et al., 2009). Análises comparativas das polimerases virais codificadas pelo JFH-1 e pelo isolado J6 (isolado semelhante ao JFH-1) demonstrou que a polimerase do JFH-1 inicia a replicação mais eficientemente, resultando em uma melhor replicação *in vitro*. Mutações na polimerase resultaram em uma conformação mais fechada desta proteína o que pode melhorar a cinética *de novo* (SIMISTER et al., 2009). Entretanto, não se sabe até o momento se esta melhor eficiência da polimerase viral é o único fator responsável por sua capacidade de replicação em um sistema de cultura de células.

3.2.11. Ciclo replicativo do vírus

3.2.11.1. Ligação do vírus à célula hospedeira

Vários fatores relacionados a célula do hospedeiro aparentemente são necessários para permitir a entrada do vírus. O primeiro fator identificado como essencial à entrada viral foi a tetraspaninas, CD81. Apesar da CD81 ser expressa em vários tipos celulares e não ser capaz de explicar o tropismo do HCV pelo fígado, a entrada do HCV nos hepatócitos é bastante prejudicada na presença de anticorpos neutralizantes para CD81 ou quando a expressão da CD81 é reduzida em células hepáticas (PILERI et al., 1998). Acredita-se que o receptor tipo scavenger classe B tipo I (SR-BI) é um outro fator que modula a entrada do vírus nas células (SCARSELLI et al., 2002). O SR-BI atua naturalmente como um receptor de lipoproteína de alta densidade (HDL) que atua regulando a entrada de colesterol de alta densidade nas células (ACTON et al., 1996) mas também pode se ligar a outras moléculas (CONNELLY; WILLIAMS, 2004), algumas das quais afetam a infectividade do HCV (LAVIE; GOFFARD; DUBUISSON, 2006; VON HAHN et al., 2006). Moléculas de HDL purificadas do plasma melhoram a entrada de pseudopartículas de HCV (HCVpp). Essa melhora da entrada de HCVpp nas células hospedeiras provavelmente depende da ligação do HDL ao SR-BI, pois o silenciamento da expressão do SR-BI por RNA de interferência (RNAi) anula o aumento da eficiência devido à associação das HCVpp com HDL (BARTOSCH et al., 2005; VOISSET et al.,

2005). Outros estudos demonstraram um efeito do IFN- α na expressão do SR-BI em hepatócitos (MURAO et al., 2008), essa observação evidencia uma provável relação entre a ação antiviral do IFN- α , inibição da entrada do HCV e expressão do SR-BI.

A co-expressão de apenas a CD81 e SR-BI é insuficiente para a entrada do vírus na célula hospedeira (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003a; HSU et al., 2003). Outras pesquisas demonstraram que fatores adicionais também são capazes de modular a entrada viral, dentre eles as proteínas de junção, CLDN1 e ocludina (EVANS et al., 2007; PLOSS; RICE, 2009). Adicionalmente, a proteína de envelope E2 do HCV se liga a outros dois receptores, CD209 e CD209L. Estes receptores são lectinas cálcio dependentes que não são expressas em hepatócitos e, portanto, não são receptores diretamente relacionados a entrada do vírus. Entretanto, CD209L e CD209 podem estar envolvidos na ligação e transferência do HCV para os hepatócitos (CORMIER et al., 2004).

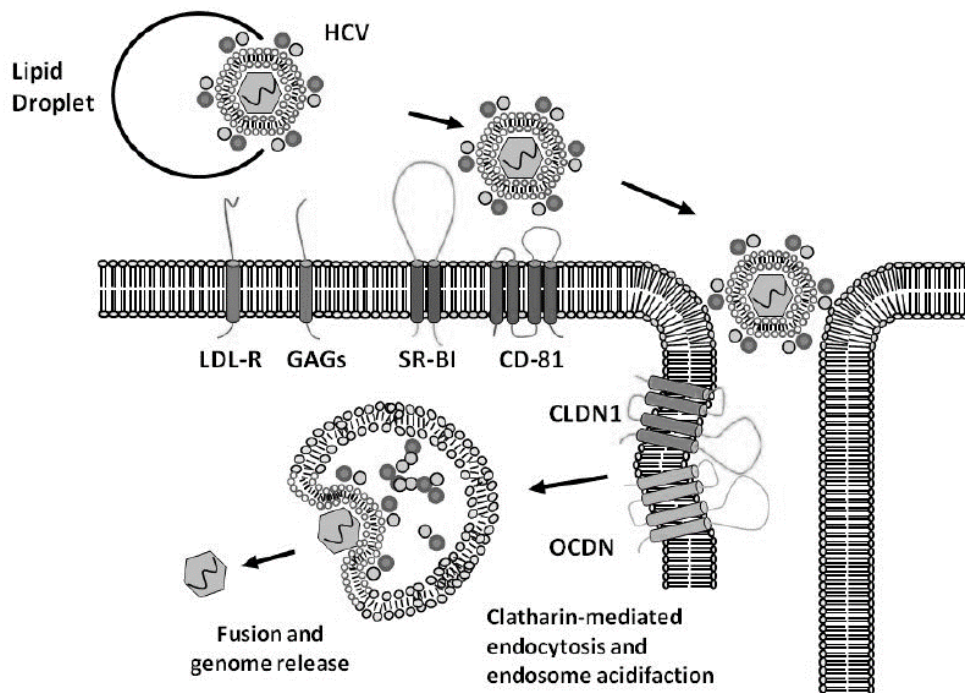


Figura 3. Partículas virais do HCV ligadas a moléculas lipídicas se ligam às células via receptor LDL. A glicoproteína viral E2 posteriormente se liga especificamente ao receptor SR-B1 (CD81). O vírus é direcionado à zona de oclusão onde interações com a CLDN-1 e OCLN facilita a endocitose. A acidificação do endossomo induz a fusão do envelope viral com a membrana endossomal resultando na liberação do genoma do vírus (EYRE; BAUMERT; BEARD, 2009).

As glicoproteínas virais E1 e E2, são as proteínas formadores do envelope do HCV e são responsáveis diretamente pela ligação do vírus aos receptores celulares e portanto possuem um papel essencial na entrada do vírus na células hospedeira. Duas regiões hipervariáveis foram identificadas na sequência da glicoproteína de envelope E2 (FORNS et al., 2000) e acredita-se que o papel dessas regiões seja uma estratégia mutacional, utilizada por vários organismos, para evadir a resposta imune do hospedeiro. Os primeiros 27 aminoácidos da proteína formam a região hipervariável 1 (HVR1). A deleção desta região resulta em uma infecção persistente, o que sugere que esta região não é essencial para a replicação viral, entretanto, a sua eliminação/substituição pode levar a uma atenuação da infecção (FORNS et al., 2000). A segunda região hipervariável (HVR2) também está presente na proteína E2 e acredita-se que é responsável pela ligação desta proteína com a CD81 (ROCCASECCA et al., 2003).

3.2.11.2. Entrada e Liberação

Após a ligação do vírus aos receptores celulares, o nucleocapsídeo dos vírus envelopados são liberados no citoplasma celular por meio de processo de fusão entre a membrana celular e envelope viral. Esta fusão é mediada por proteínas celulares especializadas e é realizada diretamente na membrana plasmática ou nos endossomos após a internalização da partícula viral. O processo de entrada é controlado pelas glicoproteínas virais de superfície que ativam as mudanças requeridas na mediação da fusão. Pelo menos duas classes de proteínas de fusão são conhecidas (LESCAR et al., 2001).

Os flavivírus entram nas células alvo por meio de endocitose mediada por receptores e a utilização de proteínas de fusão classe II (ZEISEL et al., 2009). Por analogia, acredita-se que as proteínas de envelope do HCV pertencem a classe II das proteínas de fusão. Entretanto, em contraste com outras proteínas de fusão classe II, as glicoproteínas de envelope do HCV aparentemente não requerem clivagem de proteases celulares durante o seu processo de transporte pela via secretória (OP DE BEECK et al., 2004) (Figura 3). O processo de entrada do HCV nas células é dependente de pH e de endocitose (HSU et al., 2003) entretanto a identidade da proteína do HCV responsável pela fusão ainda não é bem conhecida.

3.2.11.3. Replicação do genoma

Após a entrada no citoplasma, o genoma viral é traduzido, a poliproteína clivada e as proteínas não estruturais NS3-NS5B formam o complexo de replicação na superfície de uma rede de membranas provenientes do retículo endoplasmático (EGGER et al., 2002; GOSERT et al., 2003). O genoma de fita positiva é replicado por meio da produção de um RNA de fita negativo intermediário, que serve como fita molde para produção de novas partículas de RNA de polaridade positiva, portanto, durante a replicação do HCV, RNA de fita dupla intermediários são produzidos (dsRNA) (LINDENBACH; RICE, 2005). Genomas virais recém sintetizados podem ser traduzidos, utilizados como fita molde para novas transcrições ou empacotadas em vírions e liberadas das células. As formas intermediárias de dsRNA formam pequenos focos, associados ao retículo endoplasmático, NS5A e em menor quantidade ao Core. O complexo de replicação é responsável pela replicação específica do genoma do HCV e é específico para cada genótipo por meio do reconhecimento de sinais nas regiões não traduzíveis 5' e 3'. Regiões estruturadas da 3' UTR também são essenciais para a replicação do RNA por meio da interação com a proteína NS5B (FRIEBE et al., 2005).

Acredita-se que os complexos de replicação possuam uma fita negativa do RNA viral, um número variável de fitas positivas (até 10) e centenas de cópias das proteínas não estruturais que estão envolvidas na formação do complexo e em menor número responsáveis pela replicação direta do RNA (QUINKERT; BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2005).

3.2.11.4. Montagem e liberação

Não existe muita informação em relação aos processos tardios do ciclo replicativo do HCV devido principalmente à ausência de um modelo de estudo apropriado. Com a introdução dos sistemas *in vitro* que são capazes de produzir partículas infecciosas do HCV (WAKITA et al., 2005) algumas informações puderam ser obtidas. Sabe-se que as partículas de HCV secretadas possuem uma baixa densidade, o que sugere que o vírus se associa à lipoproteínas para a liberação viral (NIELSEN et al., 2006). A associação do HCV com lipoproteínas podem desempenhar também um papel na proteção do vírion ao sistema imune do hospedeiro.

A associação do Core com partículas lipídicas é um fator importante na montagem viral (BOULANT et al., 2006), entretanto a localização exata do sítio de montagem ainda é desconhecido. O core é capaz de se ligar ao RNA (BOULANT et al., 2005) entretanto não se sabe se ele se desliga das partículas lipídicas para iniciar o processo de empacotamento no sítios de replicação ou se a NS5A, que também possui sítios de ligação ao RNA (HUANG et al., 2005), recruta o genoma para partículas lipídicas (BARTENSCHLAGER et al., 2011). O recrutamento do envelope viral provavelmente ocorre com a adição dos heterodímeros E1/E2 no retículo endoplasmático e membranas derivadas desta organela. Outras proteínas virais também são essenciais para a produção de partículas infecciosas. Já foi demonstrado que as proteínas NS2 e p7 são necessárias nas etapas iniciais de montagem (JONES et al., 2007), possivelmente para a coordenação do complexo de replicação junto com as glicoproteínas (JIRASKO et al., 2010; MA et al., 2011; STAPLEFORD; LINDENBACH, 2011). A co-localização da E2, NS2, NS3 e NS5A em partículas lipídicas citosólicas 72h após a transfecção com RNA de um vírus completo sugere que a montagem pode estar acontecendo nesse sítio (JIRASKO et al., 2010). O processo de secreção do vírus provavelmente não é o mesmo das VLDL, que são sintetizadas no retículo endoplasmático e secretadas da célula via complexo de Golgi (BAMBERGER; LANE, 1990). Provavelmente o vírus utilize a maquinaria de tráfego endossomal, já que foi demonstrado que esta estrutura é essencial para a liberação viral (CORLESS et al., 2010).

3.2.11.5. Regiões não traduzíveis

3.2.11.5.1. 5' UTR

A região 5' não traduzível (5' UTR) do HCV contém 341 nucleotídeos e está localizada antes do ORF do códon iniciador de leitura. É a região mais conservada do genoma (a identidade nucleotídica com o GBV-B é de aproximadamente 60% e aproximadamente 50% com pestivírus) (CHOO et al., 1991; HAN et al., 1991). A região 5' UTR contém quatro domínios altamente estruturados, numerados de I a IV, contendo várias voltas e pseudo-nós (Figura 4) (BROWN et al., 1992; WANG et al., 1995). Os domínios II, III e IV em conjunto com os primeiros 12 a 30 nt da região codificante do core formam o IRES (HONDA et al., 1996). A caracterização estrutural por microscopia

eletrônica (EM) demonstrou que os domínios II, III e IV formam regiões distintas na molécula, com uma junção flexível entre os domínios II e III (BEALES; ROWLANDS; HOLZENBURG, 2001). O IRES do HCV tem a capacidade de formar um complexo de pré-iniciação por meio da ligação direta com a subunidade ribossomal 40S sem a necessidade canônica de fatores de iniciação de translação, um evento que provavelmente constitui o primeiro passo para a tradução da poliproteína viral.

Dois vírus quiméricos codificando core-NS2 e 5' UTR-NS2 dos isolados J6 e JFH-1 tiveram níveis de replicação e transcrição comparável, no entanto a construção J6 5' UTR-NS2 produziu 10 vezes mais partículas infecciosas (MATEU et al., 2008). A região 5' UTR dos isolados JFH-1 e J6 diferem por seis nucleotídeos e foi identificado que este três nucleotídeos foram responsáveis pela diferença de títulos entre os isolados (MATEU et al., 2008). Estas descobertas sugerem que a região 5' UTR desempenha um papel na montagem da partícula viral assim como nos processos de replicação e tradução, o que a torna um alvo viável para compostos antivirais (GUERNIOU et al., 2007).

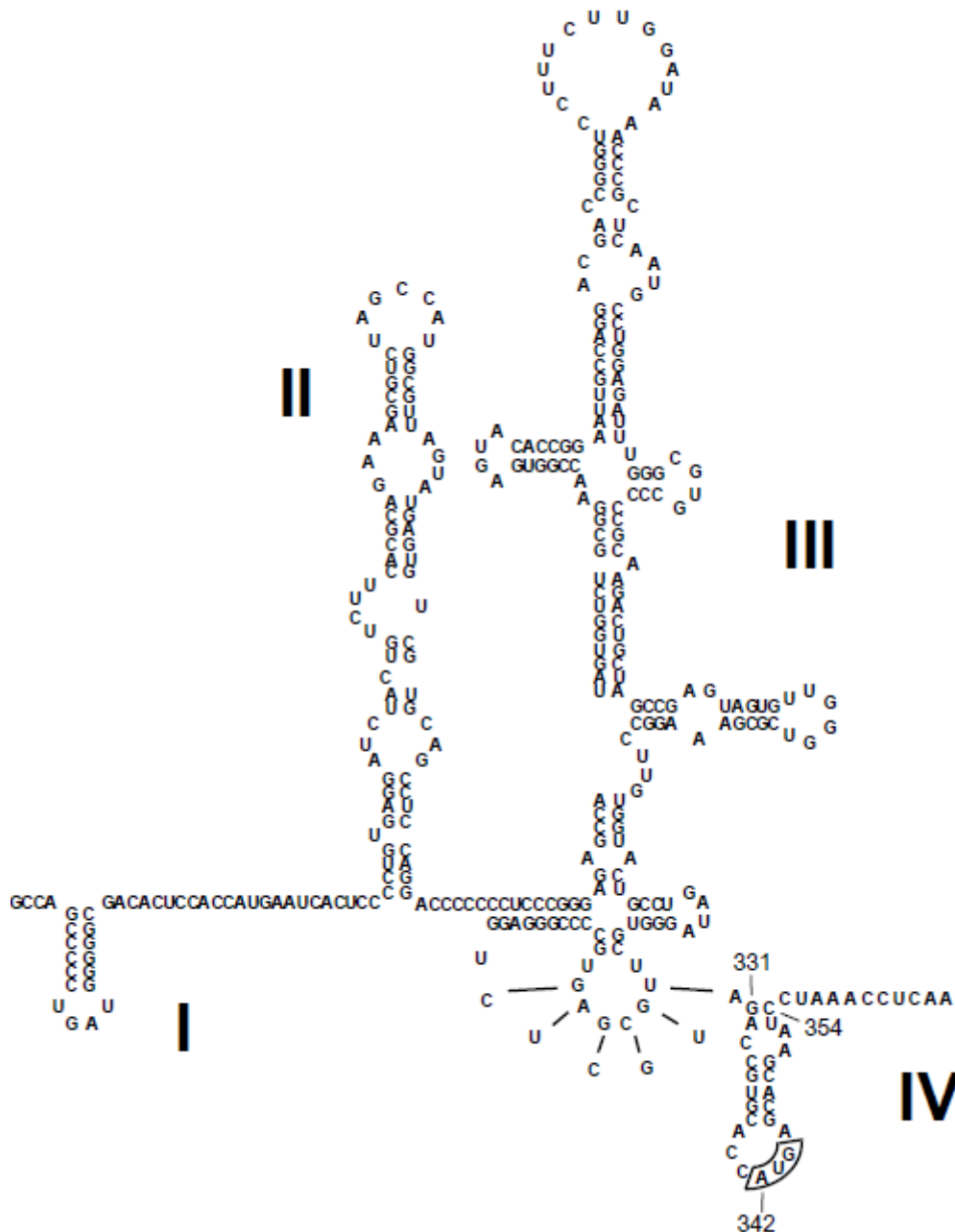


Figura 4. A região 5' UTR possui quatro estruturas stem-loop. Os loops I e II são necessários para a replicação e loops II, III e IV são utilizados no recrutamento da subunidade ribossomal 35S. O códon de iniciação localizado no loop IV está circulado (TUMBAN; PAINTER; LOTT, 2009).

3.2.11.5.2. 3' UTR

A região 3' não traduzível (3' UTR) contém aproximadamente 225 nucleotídeos. Está organizada em três regiões, incluindo primeiramente uma região variável de 30-40 nt, uma área de poly(U)-poly(U/UC) e uma sequência conservada na porção final da molécula contendo 98 nt, que inclui três regiões circulares, denominadas SL1, SL2 e SL3 (TANAKA et al., 1995; TANAKA et al., 1996). Sabe-se que a 3' UTR interage com a

proteína NS5B e com três das quatro estruturas circulares encontradas na porção final da região codificante da proteína NS5A (CHENG; CHANG; CHANG, 1999; LEE et al., 2004). A região conservada da 3' UTR e os 52 nucleotídeos anteriores, na região de poly(U), demonstraram serem essenciais para a replicação viral enquanto o restante da sequência aparenta estar relacionada com uma melhora na replicação viral (FRIEBE; BARTENSCHLAGER, 2002; YI; LEMON, 2003).

Um ensaio de afinidade de RNA foi utilizado para triar extratos celulares e foi identificado aproximadamente 70 proteínas que interagem com a região 3' UTR, algumas delas eram elementos de ligação a regiões ricas em U/UC como a hnRNP-C. Esta proteína possui como principal função estabilizar moléculas de mRNA. A função da maioria das outras proteínas identificadas ainda não foi determinada (HARRIS et al., 2006).

3.2.11.6. Proteínas estruturais

3.2.11.6.1. Core

A proteína Core do HCV, ou nucleocapsídeo, é uma proteína ligante de RNA que presumidamente forma o capsídeo viral. Esta proteína é liberada da poliproteína como um precursor de 191 aa e 23-kDa (P23). O Core pode ser identificado em vários tamanhos (17 a 23kDa) entretanto, a forma com 21kDa é considerada predominante (YASUI et al., 1998). A proteína possui três domínios: uma porção N-terminal hidrofílica de 120 aa (domínio D1), uma porção C terminal hidrofóbica de aproximadamente 50 aa (domínio D2) e os 20 aa restantes que servem como peptídeo de sinalização para a glicoproteína E1 (HARADA et al., 1991; GRAKOU, WYCHOWSKI; et al., 1993). O domínio D1 possui várias cargas positivas e está envolvido principalmente com a ligação ao RNA e localização nuclear (CHANG et al., 1994; SUZUKI et al., 1995; SUZUKI et al., 2005). O região D2 é responsável pela associação do core com membranas do retículo endoplasmático, membranas do exterior da mitocôndria e partículas lipídicas (SCHWER et al., 2004; SUZUKI et al., 2005). Tanto as moléculas ligadas à membranas quando a moléculas livres do core podem existir em estados diméricos ou poliméricos. Quando expressos em diversos sistemas *in vitro*, incluindo sistemas livre de células ou cultura de células de mamíferos a proteína core pode formar partículas semelhantes ao

nucleocapsídeo (SERAFINO et al., 1997; BAUMERT et al., 1998; PIETSCHMANN et al., 2002; BLANCHARD et al., 2003).

Além de seu papel na formação do capsídeo viral, é sugerido que o core pode interagir diretamente com várias proteínas e vias celulares que podem ser importantes para o ciclo viral (MCLAUCHLAN, 2000). Esta molécula que possui papéis pró e ante apoptose (KOUNTOURAS; ZAVOS; CHATZOPOULOS, 2003; CHOU et al., 2005; MEYER et al., 2005), estimula o crescimento de hepatócitos em um sistema *in vitro* de cultura de células Huh7 por meio a regulação transcricional de genes relacionados ao crescimento (FUKUTOMI et al., 2005) e está relacionada à danos teciduais e progressão da fibrose (NUNEZ et al., 2004). O core pode também regular a atividade de genes celulares, incluindo c-myc and c-fos e alterar a transcrição de outros promotores virais (SHIH et al., 1993; RAY et al., 1995). Além disto, o Core induz a formação de carcinoma hepatocelular quando expressa em camundongos transgênicos (MORIYA et al., 1998) e, induz a formação de partículas lipídicas e pode ter um papel direto na formação da esteatose (MORIYA et al., 1998).

3.2.11.6.2. *Frameshift protein* (F)

A tradução da poliproteína do HCV ocorre a partir de um único ORF, apesar de já ter sido demonstrado que uma mutação no AUG primário resulta em um início da tradução em um AUG localizado mais à frente no genoma (REYNOLDS et al., 1995). Outros estudos demonstraram a tradução a partir de um segundo ORF localizado dentro da região codificante do core, no frame +1/-2 (WALEWSKI et al., 2001; XU et al., 2001). A expressão da “*frameshift protein*” ou proteína de frame de leitura alternado (ARFP) é independente de proteases celulares ou virais e o produto da tradução varia entre 126 e 162 aminoácidos dependendo do genótipo analisado. Esta variação levou à uma especulação da autenticidade desde gene em uma infecção natural.

Anticorpos contra a proteína F foram identificados em soro de pacientes com infecções crônicas (WALEWSKI et al., 2001; SHESHEER KUMAR et al., 2008) e agudas (MORICE et al., 2009). Uma resposta imune celular não foi observada em indivíduos em infecção aguda (DROUIN et al., 2010) mas células T auxiliar CD4+ específicas para a proteína F foram identificadas em estudos com camundongos transgênicos (GAO et al., 2010). A proteína F aparentemente é desnecessária para a infecção viral em cultura de células entretanto, foi demonstrado altos níveis de anticorpos

contra a proteína F em pacientes com HCC, sugerindo um papel desta proteína na patogênese relacionada ao HCV (DALAGIORGOU et al., 2011).

3.2.11.6.3. E1 e E2

As duas glicoproteínas do envelope, E1 e E2, são componentes essenciais do envelope do vírion do HCV e são necessárias para entrada e fusão na célula hospedeira (BARTOSCH et al., 2003; NIELSEN et al., 2004). E1 e E2 possuem massa molecular de 33-35 kDa e 70-72 kDa respectivamente e se ligam como heterodímeros não covalentes (DELEERSNYDER et al., 1997). E1 e E2 são glicoproteínas transmembrânicas do tipo I, com domínios externos de respectivamente 160 e 360 aminoácidos e um curto domínio transmembrânico de aproximadamente 30 aa. Os domínios transmembrânicos de E1 e E2 são compostos de duas fitas de aminoácidos hidrofóbicos separados por uma curta região polar contendo resíduos conservados. Estes resíduos possuem diversas funções, incluindo o ancoramento a membrana, localização no retículo endoplasmático e montagem do heterodímero (COCQUEREL et al., 1998; COCQUEREL et al., 2000). Os domínios externos de E1 e E2 possuem várias prolina e cisteína em sua sequência, entretanto, pontes dissulfídicas intramoleculares não foram observadas (MATSUURA et al., 1994). E1 e E2 são altamente glicosiladas, contendo respectivamente de 5 a 11 sítios de glicosilação. Adicionalmente, a proteína E2 possui regiões hipervariáveis, com sequências diferindo em até 80% entre subtipos do mesmo genótipo (WEINER et al., 1991). A região hipervariável 1 (HRV1) contém 27 aminoácidos e é um importante epítopo de neutralização (ZIBERT et al., 1997). Apesar da HRV1 apresentar uma alta variabilidade, as propriedades físico-químicas dos aminoácidos em cada posição e a conformação geral desta região é altamente conservada entre todos os genomas do HCV, sugerindo uma grande importância no ciclo replicativo do HCV (PENIN et al., 2001).

A proteína E2 desempenha um papel importante nos passos iniciais da infecção. A ligação viral com a célula hospedeira é mediada pela interação da E2 com um ou vários componentes do complexo de receptores (ROSA et al., 1996; FLINT; MCKEATING, 2000). Devido a região HVR1 ser básica, com cargas positivas localizadas em posições específicas da sequência, ela pode teoricamente interagir com moléculas com cargas negativas na superfície celular. Esta interação pode desempenhar um papel no reconhecimento da célula alvo e na ligação com a mesma, assim como na

compartimentalização celular ou tecidual (BARTH et al., 2003; BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003b). Além disto, foi demonstrado que o soro humano facilita a infecção de células Huh7 por pseudopartículas de HCV, aparentemente mediada por uma interação entre as HDLs presentes no soro, HVR1 e SR-BI (BARTOSCH et al., 2005; VOISSET et al., 2005). Pouco se sabe a respeito das funções da E1 mas, acredita-se que pode estar envolvida na fusão do vírus com a membrana intracitoplasmática (ROSA et al., 1996; FLINT; MCKEATING, 2000).

3.2.11.6.4. p7

A proteína p7 é uma proteína integral de membrana (CARRERE-KREMER et al., 2002) e consiste de dois domínios transmembrânicos e um loop de carga básica, com ambas as terminações (5' e 3') direcionadas para o lúmen do retículo endoplasmático (LIN et al., 1994; CARRERE-KREMER et al., 2002). A porção C-terminal da p7 é capaz de agir como um peptídeo de sinal e aparentemente atua como um sinalizador para a proteína NS2 (CARRERE-KREMER et al., 2002). A p7 é liberada da poliproteína viral por meio da clivagens em ambas as pontas por uma peptidase de sinal. Uma mutação do aminoácido C-terminal de alanina para arginina impede a quebra do complexo p7-NS2 (COCQUEREL et al., 2002). A proteína p7 possui 63 aminoácidos e é capaz de se oligomerizar para formar um canal de íons hexamérico ou heptamérico, o que a leva a ser classificada como uma viroporina (CLARKE; KULASEGARAM, 2006; LUIK et al., 2009). Não se sabe precisamente se a p7 está incluída na partícula viral mas, sabe-se que ela é vital para a infecção *in vitro* (SAKAI et al., 2003).

A função de canal de íons da p7 pode ser inibida com a utilização da amantadina, entretanto essa inibição é dependente do genótipo analisado (STGELAIS et al., 2007; GRIFFIN et al., 2008). Esta função também pode ser inibida, independente do genótipo com a utilização da rimantadina (WOZNIAK et al., 2010; GOTTWEIN et al., 2011).

Compostos que inibem a atividade do canal de íons também bloqueiam a liberação viral, sugerindo que esta função está envolvida na morfogênese (LUIK et al., 2009; GRIFFIN, 2010). Mutações dos dois resíduos básicos na volta citoplasmática, denominado *p7 basic-loop*, também bloqueiam o canal de íons (GRIFFIN et al., 2004; STGELAIS et al., 2007) e reduzem consideravelmente a infectividade viral (JONES et al., 2007; STEINMANN et al., 2007; MA et al., 2011). A deleção completa da p7 no vírus

JFH-1 completo ou em quimeras levam a formação de partículas não-infecciosas (JONES et al., 2007; STEINMANN et al., 2007).

3.2.11.7. Proteínas não estruturais

3.2.11.7.1. NS2

A NS2 é a primeira proteína não estrutural presente no genoma do HCV, ela possui uma massa aproximada de 23 kDA e é uma proteína hidrofóbica integralmente transmembranica, clivada em sua porção N-terminal por uma peptidase de sinal e na região C-terminal por auto clivagem (GRAKOU, WYCHOWSKI; et al., 1993; MIZUSHIMA et al., 1994; SANTOLINI et al., 1995). A porção N-terminal se localiza no citosol e a região C-terminal é voltada para o lúmen do retículo endoplasmático (THIBEAULT et al., 2001). Para a realização da auto-protease, é necessário que os aminoácidos 907-1206 estejam presentes além da porção C-terminal da NS2 e ainda os 180 aminoácidos na porção inicial da proteína NS3. A atividade de serino protease da NS3 não é necessária para a auto clivagem da NS2/3 apesar de que sua presença na estrutura da proteína é mandatória (SANTOLINI et al., 1995). A NS2 associada aos dois primeiros aminoácidos da NS3 possuem uma atividade proteolítica basal, portanto, a NS2 pode ser definida como uma protease. A atividade auto proteolítica da NS2/3 pode ser inibida por agente quelantes de metal, como a Fenantrolina e/ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) entretanto, essa inibição pode ser revertida parcialmente por meio da adição de zinco à reação (PIERONI et al., 1997) indicando uma dependência deste metal na atividade proteolítica.

A proteína NS2 possui também um papel na produção de partículas virais infectantes. O domínio de protease da NS2, mas não o sítio ativo é necessário para a montagem da partícula viral, atuando provavelmente em uma etapa precoce do processo de construção da partícula (JONES et al., 2007). Estudos demonstraram que a NS2 pode ter também um papel na etapa tardia de montagem e no processo de maturação. O aminoácido S168 é necessário para a produção do vírus mas não possui papel na replicação do RNA. Ainda, a montagem viral não é mediada pela fosforilação desde resíduo de serina na NS2 e também não está envolvido na interação com o complexo NS5A/Core ou na formação do capsídeo. Mutantes S168A são capazes de produzir

víriões, entretanto os mesmos não são infecciosos, sugerindo que a NS2 pode ser responsável por conferir infectividade às partículas já montadas. Uma mutação compensatória na proteína NS5a (V464L) em resposta a mutação S168A da NS2 recupera a produção de partículas infecciosas para níveis até 10x maior que o vírus selvagem, sugerindo portanto que a interação da NS2 com a proteína NS5A. Portanto, dados sugerem que a NS2 e NS5A estão envolvidas no processo de maturação viral (YI et al., 2009).

Por fim, a NS2 é capaz de modular as vias de sinalização celular. A porção N-terminal desta proteína viral está envolvida na inibição da expressão de genes celulares (KAUKINEN et al., 2006). Ainda, NS2 se liga diretamente a fatores pró-apoptóticos presentes em células hepáticas (CIDE-B) e esta ligação pode regular negativamente a disponibilidade deste fator no interior da célula, prevenindo a liberação de citocromo C e portanto evitando a indução da apoptose via CIDE-B (ERDTMANN et al., 2003).

3.2.11.7.2. NS3

A NS3 é uma proteína multifuncional e é a única proteína viral na qual a maturação é independente de membranas (ERRINGTON et al., 1999; SVITKIN et al., 2005). Os 189 aminoácidos da região N-terminal formam uma serino protease semelhante à quimiotripsina. Os aminoácidos 57 (histidina), 81 (ácido aspártico) e 139 (serina) formam a tríade catalítica do sítio ativo. Um sítio de ligação aos íons de zinco é formada por três resíduos de cisteína (97, 99 e 145) e um de histidina (149), entretanto, acredita-se que este sítio está relacionado à estabilização estrutural da molécula e não está envolvido na função catalítica (DE FRANCESCO et al., 1996; STEMPIAK et al., 1997). A protease NS3 é responsável pela separação da junção NS3/4A e em associação à NS4A quebra as junções do restantes da poliproteína (GRAKOU, MCCOURT; et al., 1993a; HIJIKATA et al., 1993; TOMEI et al., 1993; FAILLA; TOMEI; DE FRANCESCO, 1994). Algumas drogas anti-HCV, foram desenvolvidas para redução/eliminação da atividade proteolítica da NS3/4A. O domínio da serino-protease também é necessário para quebra eficiente da junção NS2/3 (THIBEAULT et al., 2001). A ligação da NS4A à NS3 induz uma mudança conformacional da NS3 (KIM et al., 1995; YAN et al., 1998). A protease NS3/4A também possui um papel na inibição das respostas antivirais celulares, por meio de clivagem da proteína antiviral sinalizadora da mitocôndria (MAVS) (LI et al., 2005).

Os dois terços finais da NS3 atuam como helicase e NTPase (KIM et al., 1995) e não existe dependência de função entre a helicase e a protease (GALLINARI et al., 1998). A helicase se movimenta na direção 3' – 5' (TAI et al., 1996) e demonstrou ser capaz de desenrolar fitas dupla de RNA e complexos RNA-DNA. A função de helicase é dependente de uma dimerização da NS3 (SEREBROV; PYLE, 2004) e esta atividade é dependente de ATP e cátions divalentes (SUZICH et al., 1993; WARDELL et al., 1999; FRICK; BANIK; RYPMA, 2007). Tanto as funções de helicase quanto a ATPase são inalteradas pela presença de NS2 não clivada (NS2/3) (WELBOURN et al., 2005).

A mutação Q221L dentro da região da helicase foi originalmente descrita em um modelo quimérico H77/JFH-1 e verificou-se que é capaz de aumentar a infectividade do vírus quimérico (YI et al., 2006; MA et al., 2008) assim como do isolado JFH-1 selvagem (MA et al., 2008). Posteriormente foi identificado que esta mutação é capaz de recuperar a infectividade de construções com mutações deletérias na NS2 (PHAN et al., 2009; JIRASKO et al., 2010). Por outro lado, a introdução desta mutação na quimera já altamente infecciosa JC1/JFH-1 não melhorou a infectividade (PHAN et al., 2009). O papel deste aminoácido provavelmente não está relacionado a uma interação direta com a NS2, já que um grande número de mutações na NS2 foram recuperadas a partir da introdução da Q221L. O mecanismo pelo qual este resíduo melhora a infectividade ainda não é bem conhecido já que outras duas mutações (I286V e I399V) foram capazes de funcionalmente substituir a Q221L em um modelo H77S/JFH-1 (Ma et al., 2008). Análises função enzimática da NS3 utilizando vírus contendo a mutação e partículas selvagens demonstraram pouca diferença na função, exceto que o vírus mutante possui uma menor afinidade pela ligação ao RNA e uma menor capacidade de desdobramento do RNA. (PHAN et al., 2009)

3.2.11.7.3. NS4A

A NS4A é uma proteína relativamente pequena (8 kDa) (GRAKOU, MCCOURT; et al., 1993b) e atua como um elemento de fixação ao retículo endoplasmático para a NS3 (KIM et al., 1999) por meio de sua porção hidrofóbica N-terminal (WOLK et al., 2000). Esta proteína ainda atua como um cofator para a protease NS3 (FAILLA; TOMEI; DE FRANCESCO, 1994) por meio da interação com a porção N-terminal da NS3 (LIN; RICE, 1995), formando a protease NS3/4a (KIM et al., 1996). Devido a semelhança de funções, a NS4A é comparada à proteína NS2B dos flavivírus,

esta última também atua como um cofator para a sua protease viral (FAILLA; TOMEI; DE FRANCESCO, 1994). A melhora da função devido a co-fatoração da NS4A na protease NS3/4A provavelmente está relacionada a mudanças estruturais na conformação terciária da NS3, alterando a tríade catalítica (BIANCHI et al., 1997). Foi demonstrado também que a NS4A pode interagir com membranas mitocondriais, causando danos mitocondrial e, conseqüentemente, causando liberação de citocromo-c e indução de apoptose por meio da ativação da caspase-3 (NOMURA-TAKIGAWA et al., 2006).

3.2.11.7.4. NS4B

A proteína NS4B possui tamanho de 27 kDa e é uma proteína transmembranica integral capaz de se direcionar autonomamente para membranas do retículo endoplasmático, indicando a presença de uma sequência de sinal interno (GRAKOU, WYCHOWSKI; et al., 1993; HUGLE et al., 2001). A NS4B é capaz de alterar a formação de membranas e portanto, é considerada como responsável pela arquitetura da rede de membranas associada ao complexo de replicação do HCV, essencial para a replicação viral (EGGER et al., 2002). Ambas as terminações desta proteína são processadas pela protease NS3/4A e acredita-se que sua conformação é caracterizada por 4 domínios transmembrânicos com ambas as terminações orientadas para o citosol (LUNDIN et al., 2003; LUNDIN et al., 2006; LASKUS et al., 2007). Em alguns casos, pode ser observado que uma pequena parte da população de NS4B pode assumir uma topologia diferente, com a região N-terminal direcionada para o interior do retículo endoplasmático, assumindo assim uma conformação que é comum para outras NS4B da família Flaviviridae (LUNDIN et al., 2003). Entretanto, este fenômeno é raro quando a NS4B é co-expressa com o NS5A (LUNDIN et al., 2006). A porção C-terminal da NS4B é responsável pela modulação da atividade da NS3/4A, hiperfosforilação da NS5A e replicação do genoma (LINDENBACH et al., 2007).

Esta proteína pode ser encontrada em duas populações, uma móvel com localização difusa na membrana do retículo endoplasmático e outra imóvel, firmemente ligada à membrana do retículo e formando pequenos focos. Acredita-se que população imóvel é responsável pela formação do complexo de replicação (GRETTON; TAYLOR; MCLAUCHLAN, 2005). A NS4B é necessária para a co-localização dos componentes do complexo de replicação e para a replicação do RNA (ELAZAR et al., 2004). Mutações

na porção C-terminal da NS4B alteram a sua localização celular e previnem o recrutamento das proteínas NS3 e NS5A (ALIGO et al., 2009).

3.2.11.7.5. NS5A

A proteína NS5A é essencial para a replicação do genoma viral e é um componente importante do complexo de replicação (MACDONALD; HARRIS, 2004). Esta proteína existe em dois estados de fosforilação: fosforilação basal p56 (56 kDa) e a forma hiperfosforilada p58 (58 kDa) (HUANG et al., 2005). Estudos computacionais e posteriormente *in vitro* confirmam a existência de três domínios na NS5A, separados por duas regiões de baixa complexidade (LCS) (TELLINGHUISEN et al., 2004). Esta proteína se associa à membranas por meio de uma sequência direcionadora de membrana existente no domínio I. A expressão dos 30 aminoácidos da porção N-terminal da NS5A fundidos à eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) alterou o padrão de localização da eGFP para um padrão semelhante ao identificado pela NS5A (BRASS et al., 2002; ELAZAR et al., 2003). Estes resíduos são conservados, especialmente a sua característica hidropática e estudos demonstraram que os aminoácidos 4-26 se assemelham à uma hélice anfipática (BRASS et al., 2002; ELAZAR et al., 2003). Estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) demonstraram que o domínio um possui uma característica de alfa-hélice com um “loop” flexível no meio (PENIN et al., 2004). A NS5A é capaz de se associar à membranas, o que é vital para o desenvolvimento da sua função na replicação viral (ELAZAR et al., 2003).

Domínios similares ao domínio I da NS5A foram identificados em outros vírus (SAPAY et al., 2006; BRASS et al., 2007). Um peptídeo sintético de 18 aa sintetizado a partir da sequência da alfa-hélice da NS5A apresentou uma potente ação antiviral contra o HCV e outros vírus envelopados com RNA de fita simples. Acredita-se que a função deste peptídeo é a quebra dos envelopes virais (BOBARDT et al., 2008).

Análises estruturais do domínio I demonstraram que este pode formar duas conformações diméricas diferentes e podem desempenhar diversos papéis no ciclo viral (TELLINGHUISEN; MARCOTRIGIANO; RICE, 2005; LOVE et al., 2009). Os domínios II e III aparentemente são pouco estruturados (LIANG et al., 2007; HANOULLE et al., 2009; HANOULLE et al., 2010) e flexíveis, características que permitem a formação de diversas interações proteína-proteína. Acredita-se que a NS5A possa modular a replicação por meio da interação com o RNA do HCV (HUANG et al.,

2005) e NS5B (SHIROTA et al., 2002). A ligação da NS5A com o RNA envolve todos os três domínios e ocorre preferencialmente na região poly(U/UC) da região 3' UTR, já a NS5B se liga preferencialmente na porção final do RNA da região 3' UTR (FOSTER et al., 2010).

A NS5A é uma proteína rica no aminoácido prolina e sabe-se que ela é capaz de interagir com diversas proteínas celulares com o objetivo de modular o ambiente celular e o ciclo viral (MACDONALD; HARRIS, 2004). A NS5A contém dois sítios ricos em prolina dentro da área de baixa complexidade que separa os domínios 2 e 3. Estas regiões ricas em prolinas se ligam à proteínas celulares que possuem domínios homólogos à Src (SH3). Dentro do domínio 2 está contida a região determinante de sensibilidade ao interferon (ISDR), que foi identificada por meio da comparação de sequências de amostras de pacientes sensíveis ou não ao tratamento com IFN e posteriormente as informações foram confirmadas por mutagênese (ENOMOTO et al., 1995; ENOMOTO et al., 1996). Entretanto, outros estudos questionam a correlação entre este domínio e restante da proteína na determinação da sensibilidade ao IFN (AIZAKI et al., 2000; BRILLET et al., 2007). O domínio III da NS5A não é necessário para a replicação do RNA (APPEL et al., 2008; TELLINGHUISEN; FOSS; TREADAWAY, 2008). Estudos de deleção e troca de domínio (KIM et al., 2011) demonstraram que este domínio exerce um papel importante na morfogênese. Outros estudos demonstraram que aminoácidos específicos no domínio III e LCSII regulam o processo de montagem viral mediada pela NS5A (MASAKI et al., 2008; TELLINGHUISEN; FOSS; TREADAWAY, 2008; HUGHES et al., 2009).

3.2.11.7.6. NS5B

A NS5B é uma proteína de 65 kDa, localizada na porção C-terminal da poliproteína (GRAKOU, WYCHOWSKI; et al., 1993) e que codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (BEHRENS; TOMEI; DE FRANCESCO, 1996). A RdRp possui um sítio altamente conservado formado por três aminoácidos, uma glicina e dois aspartatos (*GDD motif*) flanqueado por sequências hidrofóbicas. Esse sítio conservado é encontrado também na RdRp de outros flavivírus, pestivírus e poliovírus (KAMER; ARGOS, 1984; POCH et al., 1989). Estudo cristalográfico da NS5B demonstrou que a mesma possui um sítio ativo envolvido por cadeia de polipeptídios e com as estruturas tipo *finger* e *thumb* em contato uma com a outra. Entretanto, esta enzima

não possui a forma clássica de “U” característica de outras polimerases. A região central do sítio ativo contém cinco regiões conservadas, sendo a região A e C envolvidas na seleção do nucleotídeo e a região B contém o sítio GDD que é requerido para a ligação de NTPs. A função da região D ainda não é bem conhecida enquanto a região E está envolvida na interação da fita iniciadora (LESBURG et al., 1999). NS5B possui um direcionamento para o retículo endoplasmático, ou membranas derivadas do mesmo, via uma porção C-terminal de 21 resíduos (YAMASHITA et al., 1998; SCHMIDT-MENDE et al., 2001) que atua como ancora transmembranica (IVASHKINA et al., 2002). A NS5B requer a presença de íons metálicos divalentes Mg^{2+} ou Mn^{2+} para poder coordenar a reação catalítica (FERRARI et al., 1999). A dimerização da NS5B é um pré-requisito para a função de polimerase desta proteína (QIN et al., 2002). A replicação provavelmente se inicia *de novo* na região 3' UTR por meio de uma modificação no domínio *thumb* (CHENG; CHANG; CHANG, 1999; BRESSANELLI et al., 2002). A RdRp não contém qualquer mecanismo de correção e a taxa de erro desta enzima é estimada em 10^{-4} erros nucleotídeo/ano (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000).

O papel da NS5B como uma RdRp faz com que esta proteína inevitavelmente faça parte do complexo de replicação; já foi demonstrado que ela é capaz de se ligar diretamente a NS5A e NS3 e, estas duas últimas junto com a NS4B são capazes de modular a atividade da polimerase (PICCININNI et al., 2002; SHIROTA et al., 2002). Apesar de estudos *in vitro* terem demonstrado que a RdRp não necessita de nenhum cofator, foi demonstrado que a NS5B é capaz de interagir com proteínas celulares. Dentre essas proteínas estão incluídas helicases, ATPase/helicase dependentes de RNA e a helicase de RNA p68. Estas interações melhoram a replicação do RNA viral, provavelmente como uma consequência do desenovelamento das estruturas secundárias do RNA (KYONO; MIYASHIRO; TAGUCHI, 2002; GOH et al., 2004). Duas outras proteínas celulares também atuam em conjunto com a NS5B, a CyPA e CyPB, que se ligam à proteína viral via sítio ativo, estimulam a RdRp e resultam num aumento da síntese de RNA (CHATTERJI et al., 2009; HECK; MENG; FRICK, 2009).

3.3. RNA de interferência

3.3.1. Identificação da via

O fenômeno da interferência por RNA (RNAi) foi identificado pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* como uma resposta a introdução de RNA de fita dupla no organismo deste nematódeo, o que resultou em um silenciamento gênico sequência-específico (FIRE et al., 1998). O estudo com *C. elegans* foi baseado em outro estudo (GUO; KEMPHUES, 1995) que demonstrou que a introdução de uma fita simples de RNA complementar (antisense) ao gene alvo era capaz de reduzir a expressão deste gene. Este mesmo estudo demonstrou que também era possível um silenciamento gênico a partir da introdução de uma fita simples de RNA com sequência homóloga (sense) ao gene alvo. No trabalho com *C. elegans* os pesquisadores tentavam utilizar a metodologia da introdução da fita de RNA antisense para inibir a expressão gênica neste nematódeo. O grande diferencial deste trabalho foi a decisão dos pesquisadores em testar a introdução de ambas as fitas de RNA (sense e antisense) simultaneamente no organismo do animal. Inesperadamente Fire e seus colaboradores (1998) verificaram que o RNA de fita dupla teve um efeito 10 vezes mais potente no silenciamento do gene alvo em relação a introdução somente de uma fita de RNA (FIRE et al., 1998). Neste mesmo trabalho os pesquisadores ainda demonstraram que o dsRNA injetado deve ser complementar à sequência de mRNA já processada, sem introns, levando à conclusão que o processo de interferência era pós-transcricional e ocorria provavelmente no citoplasma e não no núcleo.

Posteriormente foi comprovado que o mecanismo de RNAi está presente numa grande variedade de organismos, como fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (HANNON, 2002). Contudo, a introdução de moléculas de dsRNA em células de mamíferos induz a ativação da via de IFN, levando a morte celular. Este problema foi resolvido por meio da utilização de pequenas moléculas de dsRNA (< 25 nt), denominadas *short interfering RNA* (siRNA) (ELBASHIR et al., 2001). Desde então o siRNA vem sendo utilizado amplamente como uma ferramenta de silenciamento gênico. Em 2002, apenas um ano após a identificação do siRNAi, 234 diferentes trabalhos já haviam sido publicados referentes à este mecanismo (KOLE; KRAINER; ALTMAN, 2012); de 2002-2013 foram publicados mais de 39 mil trabalhos relacionados ao assunto, 2013 somente nos primeiros sete meses do ano de 2013. Notavelmente, em 2003, apenas

dois anos após a primeira publicação do siRNAi, o primeiro estudo utilizando um modelo *in vivo* foi publicado (SONG et al., 2003). Neste estudo, utilizando moléculas de siRNA foi possível reduzir a expressão do gene FAS em um camundongo modelo de hepatite fulminante.

3.3.2. Mecanismo de ação

O termo RNAi é um termo geral no qual um RNA de fita dupla (dsRNA) precursor leva a uma redução na expressão de um gene homólogo de maneira pós-transcricional. Estudos bioquímicos e genéticos revelaram o mecanismo detalhados no qual dsRNA podem mediar o silenciamento de genes alvo. Em geral o mecanismo de RNAi envolve duas etapas: a etapa iniciadora e a etapa efetora.

Na etapa inicial, dsRNA longos (>30 nt), os quais são produzidos por genes endógenos, partículas virais, elementos de transposição ou transgenes experimentais, são reconhecidos por uma proteína com afinidade pelo RNA, a R2D2 (TABARA et al., 2002; LIU et al., 2003). Este complexo é reconhecido e processado pela enzima Dicer (BERNSTEIN et al., 2001). A Dicer é uma proteína relativamente grande (220 kDa) contendo um domínio com afinidade para dsRNA (dsRBD), dois sítios catalíticos tipo RNase III, um domínio com função de helicase e finalmente um domínio PAZ (BERNSTEIN et al., 2003). que acredita-se estar relacionado ao processo de transferência do RNA processado para o complexo RISC. Esta proteína é responsável pela linearização e quebra de moléculas longas de dsRNA em pedaços menores com 21 nt de extensão e *overhangs* de 1 ou 2 nt nas regiões 5' e 3' denominados *short interfering RNA* (siRNA). A presença conservada desta proteína em levedura (VOLPE et al., 2003), plantas, *C. elegans* (KNIGHT; BASS, 2001), *Drosophila*, camundongos (BERNSTEIN et al., 2003) e humanos (ZHANG et al., 2002) sugere que a via de RNAi compartilha os mesmos mecanismos básicos entre estes organismos.

Na etapa efetora, os siRNAs são incorporados em complexo de nuclease multicompetente, o denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (HAMMOND et al., 2000). Os componentes ativos do RISC são endonucleases denominadas proteínas argonautas, responsáveis pela quebra da fita de mRNA complementar ao siRNA inserido no complexo (PREALL; SONTHEIMER, 2005). Como os fragmentos produzidos pela dicer são de fita dupla, em teoria cada fita poderia agir como molde para identificação do mRNA complementar. Entretanto, apenas uma das

fitas, que passa a ser denominada fita guia, se liga à proteína argonauta e atua no silenciamento gênico. A outra fita de RNA, denominada fita antisense ou passageira, é degradada após a ativação do complexo RISC (GREGORY et al., 2005) (Figura 5). O processo de separação das duas fitas é um evento independente de ATP e é realizado diretamente pelas proteínas do complexo RISC (MATRANGA et al., 2005; LEUSCHNER et al., 2006). Entretanto, em ensaios *in vitro* foi demonstrado que o ATP pode ser necessário para a linearização e remoção do mRNA alvo do complexo RISC após o evento de clivagem (HALEY; ZAMORE, 2004). A fita de RNA escolhida como fita guia normalmente é aquela na qual a região 5' está menos pareada à seu complemento (SCHWARZ et al., 2003), o que facilita a sua incorporação no complexo RISC (PREALL et al., 2006).

O processo no qual o complexo RISC ativado localiza o mRNA complementar no interior da célula ainda não é bem conhecido. Estudos demonstraram que a clivagem do mRNA alvo não está relacionado ao processo de tradução (SEN; WEHRMAN; BLAU, 2005) e, que, a RNAi pode ser ainda mais efetiva contra os mRNAs que não são traduzidos (GU; ROSSI, 2005). Ainda sabe-se que as proteínas argonautas estão localizadas em regiões citoplasmáticas denominadas corpos-P, ou corpos citoplasmáticos. Nos corpos-P são encontrados uma grande quantidade de mRNA, especialmente aqueles não mais necessários e/ou não utilizados para serem posteriormente destruídos (LIAN et al., 2006). Por fim sabe-se que a destruição dos corpos-P diminui consideravelmente a eficiência da RNAi (JAKYMIW et al., 2006).

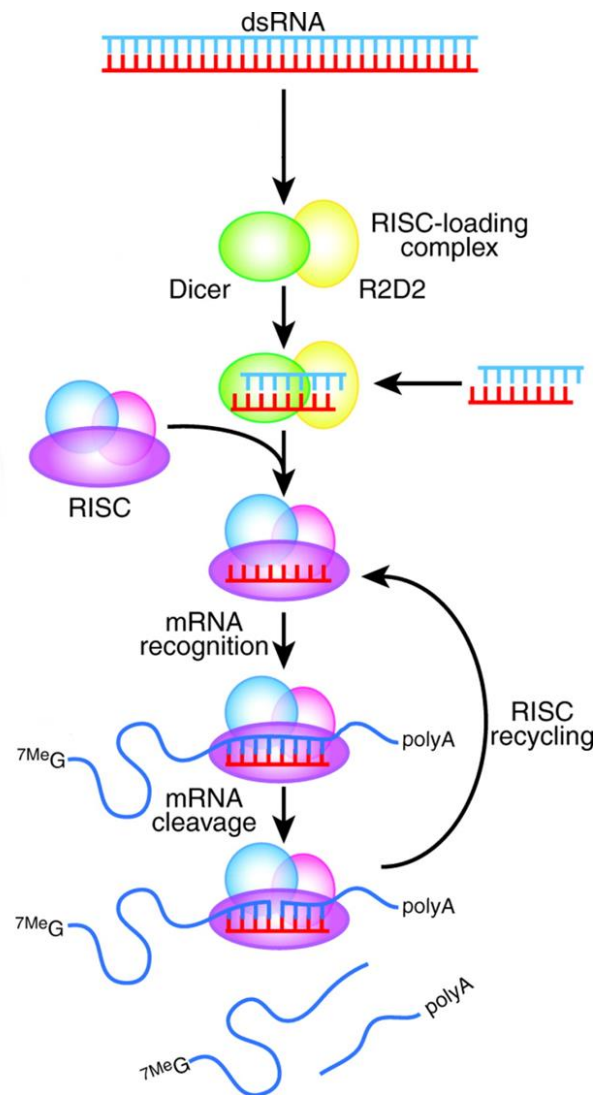


Figura 5. Via de processamento do RNAi. RNAs de fita dupla exógenos são reconhecidos pela endonuclease DICER e é clivado em pedaços menores de 21 nt. Os fragmentos são incorporados no complexo RISC onde uma das fitas é utilizada como guia para identificação de mRNAs alvos que são posteriormente clivados e inativados (DOMINSKA; DYKXHOORN, 2010).

3.3.3. Moléculas efetoras

3.3.3.1. shRNA

Short hairpin RNA (shRNA) é um molécula de RNA em forma de grampo que é criada geralmente por meio do processamento de moléculas nas células alvo (PADDISON et al., 2002). Os shRNAs podem ser produzidas a partir de plasmídeos ou vetores virais desenhados para um silenciamento gênico transiente ou a longo prazo

(AMARZGUIOUI; ROSSI; KIM, 2005). Essencialmente, vetores exógenos codificando uma construção de shRNA são transfectados na linhagem celular desejada, este vetor é levado até o núcleo celular onde é expresso como um pri-shRNA. Uma nuclease denominada Droscha, quebra o pri-shRNA em um fragmento menor, denominado pre-shRNA. Uma proteína de membrana especializada, denominada exportina-5 (Exp5) transfere pre-shRNA para o citoplasma, onde é reconhecido e processado pela enzima Dicer, sendo finalmente transformado em siRNA. Após o processamento pela Dicer, a molécula de siRNA é incorporada ao complexo RISC e utilizada na clivagem de mRNAs alvos como descrito anteriormente (LIU et al., 2004; DE FOUGEROLLES et al., 2007)

3.3.3.2. siRNA

Moléculas de siRNA sintetizadas quimicamente são a forma mais simples de RNAi. Estas moléculas são desenhadas usando diversos algoritmos (AMARZGUIOUI; PRYDZ, 2004; REYNOLDS et al., 2004; UI-TEI et al., 2004) de forma a mimetizarem os produtos finais do processamento de dsRNA pela dicer. Normalmente os siRNA são sintetizados com cada fita do duplex contendo 21 nt de extensão entretanto, são desenhados de forma assimétrica de forma que possuam 19 nt de homologia entre as duas fitas e 2 nt livres na extremidade 3' (AMARZGUIOUI; PRYDZ, 2004). Utilizando-se essa estratégia, acredita-se que é possível indicar ao complexo RISC qual das fitas deverá ser utilizada como fita guia, devido à instabilidade gerada por esta assimetria na região 5' do duplex de RNA (UI-TEI et al., 2004). Quando transfectadas em células as moléculas de siRNA são imediatamente reconhecidas pelo complexo RISC e usadas como molde para inibição do gene alvo (HARBORTH et al., 2001). Um dos principais problemas na utilização de siRNAs sintéticos na RNAi é a dificuldade de transfecção destas moléculas em algumas linhagens celulares. Para um ensaio de RNAi ser considerado eficaz é preciso reduzir em mais de 70% a expressão do gene alvo, o que as vezes nem sempre é possível alcançar, devido principalmente a baixa eficiência de transfecção de alguns reagentes e/ou tipos celulares. Um outro problema na utilização dos siRNAs canônicos é a duração limitada de seus efeitos inibitórios, geralmente o silenciamento do alvo atinge o seu ápice 24h após a transfecção e começa reduzir após 48h (RAO et al., 2009).

3.3.3.3. DsiRNA

Dicer substrate RNAs (DsiRNAs) são moléculas de RNA de fita dupla com 27 nucleotídeos de extensão que são capazes de inibir um alvo específico de mRNA sem ativar a via do IFN (KIM et al., 2005). Essas moléculas de DsiRNA são reconhecidas pela enzima dicer e digeridas em fragmento menores (21 nt) de dsRNA que são posteriormente incorporados no complexo RISC para finalmente degradar o mRNA alvo. Estudos recentes demonstraram que os DsiRNAs são mais potentes que os siRNA convencionais sintéticos (PICHU et al., 2012; ZHOU et al., 2013). Ao contrário das moléculas tradicionais de siRNA (21 nt), estas moléculas de 27 nucleotídeos de extensão precisam ser primeiramente processada pela enzima Dicer para entrar na via de RNAi. Acredita-se que a enzima Dicer possa ter um papel na incorporação da molécula de siRNA recém processada por ela no complexo RISC e isto talvez explicaria a melhor eficiência das DsiRNAs frente aos siRNAs tradicionais que não são processados pela Dicer e são incorporados diretamente no complexo RISC (KIM et al., 2005)

3.3.4. HCV x RNAi

Alguns trabalhos 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). Como alvo para o silenciamento gênico, já foram testadas várias regiões do vírus, dentre elas os genes codificantes das proteínas não estruturais NS3, NS4B, NS5B e a região não traduzível 5' UTR e em todas a capacidade de silenciamento variou entre 80-90% (KAPADIA; BRIDEAU-ANDERSEN; CHISARI, 2003; RANDALL; GRAKOU; RICE, 2003; WILSON et al., 2003; YOKOTA et al., 2003). A diferença na eficácia do silenciamento pode estar ligada principalmente à eficiência dos mecanismos de transfecção ou expressão utilizados nos diferentes estudos. Contudo, aparentemente, todas as regiões do RNA do HCV estão acessíveis à maquinaria da RNAi (WATANABE; UMEHARA; KOHARA, 2007).

Outra abordagem que vem sendo testada é a utilização de fatores celulares do hospedeiro como alvos para o silenciamento gênico. Várias proteínas celulares do hospedeiro, essenciais para o ciclo de replicação do vírus foram estudadas, dentre as que

tiveram melhores resultados estão a eIF2B γ , hVAP-33 o receptor celular CD81 (ZHANG et al., 2004; KORF et al., 2005).

Apesar da boa capacidade de inibição da replicação do vírus, foi demonstrado *in vitro* que após duas semanas, o tratamento com siRNA direcionado para a região NS5A pode resultar no desenvolvimento de mutações nas regiões alvo da molécula de siRNA, sendo essas modificações uma das responsáveis pela diminuição da eficácia da RNAi para os HCV ao longo do tempo (KONISHI et al., 2006).

Este fenômeno de evasão do sistema de RNAi já era conhecido para outros vírus como o HIV (DAS et al., 2004) e os poliovírus (GITLIN; KARELSKY; ANDINO, 2002). Estudos realizados com estes dois vírus demonstraram que a utilização simultânea de duas ou mais moléculas de siRNA pode diminuir a taxa de evasão viral devido mutações pontuais nos sítios alvo das partículas de siRNA (GITLIN; STONE; ANDINO, 2005).

Referências bibliográficas

ACTON, S. et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science**, v. 271, n. 5248, p. 518-20, Jan 26 1996.

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.

AIZAKI, H. et al. Suppression of interferon-induced antiviral activity in cells expressing hepatitis C virus proteins. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 12, p. 1111-20, Dec 2000.

ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732-8, Oct 18 2001.

ALIGO, J. et al. Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. **Virology**, v. 393, n. 1, p. 68-83, Oct 10 2009.

ALTER, H. J. To have B or not to have B: vaccine and the potential eradication of hepatitis B. **J Hepatol**, v. 57, n. 4, p. 715-7, Oct 2012.

ALTER, H. J. et al. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. **Lancet**, v. 1, n. 8062, p. 459-63, Mar 4 1978.

AMARZGUIOUI, M.; PRYDZ, H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 4, p. 1050-8, Apr 16 2004.

AMARZGUIOUI, M.; ROSSI, J. J.; KIM, D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. **FEBS Lett**, v. 579, n. 26, p. 5974-81, Oct 31 2005.

APPEL, N. et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000035, Mar 2008.

ARGUEDAS, M. R.; FALLON, M. B. Hepatitis A. **Curr Treat Options Gastroenterol**, v. 7, n. 6, p. 443-450, Dec 2004.

ASHFAQ, U. A. et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. **Virol J**, v. 8, p. 161, 2011.

ASSELAH, T.; BENHAMOU, Y.; MARCELLIN, P. Protease and polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C. **Liver Int**, v. 29 Suppl 1, p. 57-67, Jan 2009.

BAMBERGER, M. J.; LANE, M. D. Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 7, p. 2390-4, Apr 1990.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 7, p. 1631-48, Jul 2000.

BARTENSCHLAGER, R. et al. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 2, p. 95-103, Feb 2011.

BARTH, H. et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, p. 41003-12, Oct 17 2003.

BARTOSCH, B. et al. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 24, p. 14199-204, Nov 25 2003.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. **J Exp Med**, v. 197, n. 5, p. 633-42, Mar 3 2003a.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 5, p. 633-642, 2003b.

BARTOSCH, B. et al. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. **J Virol**, v. 79, n. 13, p. 8217-29, Jul 2005.

BASSETT, S. E.; BRASKY, K. M.; LANFORD, R. E. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. **J Virol**, v. 72, n. 4, p. 2589-99, Apr 1998.

BAUMERT, T. F. et al. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. **J Virol**, v. 72, n. 5, p. 3827-36, May 1998.

BEALES, L. P.; ROWLANDS, D. J.; HOLZENBURG, A. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. **RNA**, v. 7, n. 5, p. 661-70, May 2001.

BEAMES, B.; CHAVEZ, D.; LANFORD, R. E. GB virus B as a model for hepatitis C virus. **ILAR J**, v. 42, n. 2, p. 152-60, 2001.

BEHRENS, S. E.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 15, n. 1, p. 12-22, Jan 2 1996.

BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 18 2001.

BERNSTEIN, E. et al. Dicer is essential for mouse development. **Nat Genet**, v. 35, n. 3, p. 215-7, Nov 2003.

BIANCHI, E. et al. Complex formation between the hepatitis C virus serine protease and a synthetic NS4A cofactor peptide. **Biochemistry**, v. 36, n. 25, p. 7890-7, Jun 24 1997.

- BISSIG, K. D. et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. **J Clin Invest**, v. 120, n. 3, p. 924-30, Mar 2010.
- BLANCHARD, E. et al. Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. **J Virol**, v. 77, n. 18, p. 10131-8, Sep 2003.
- BLIGHT, K. J.; KOLYKHALOV, A. A.; RICE, C. M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. **Science**, v. 290, n. 5498, p. 1972-4, Dec 8 2000.
- 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.
- BOBARDT, M. D. et al. Hepatitis C virus NS5A anchor peptide disrupts human immunodeficiency virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 14, p. 5525-30, Apr 8 2008.
- BOONSTRA, A. et al. Experimental models for hepatitis C viral infection. **Hepatology**, v. 50, n. 5, p. 1646-55, Nov 2009.
- BOULANT, S. et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. **J Biol Chem**, v. 281, n. 31, p. 22236-47, Aug 4 2006.
- BOULANT, S. et al. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. **J Virol**, v. 79, n. 17, p. 11353-65, Sep 2005.
- BRADLEY, D. W. et al. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. **J Infect Dis**, v. 148, n. 2, p. 254-65, Aug 1983.
- BRASS, V. et al. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem**, v. 277, n. 10, p. 8130-9, Mar 8 2002.
- BRASS, V. et al. Conserved determinants for membrane association of nonstructural protein 5A from hepatitis C virus and related viruses. **J Virol**, v. 81, n. 6, p. 2745-57, Mar 2007.
- BRESSANELLI, S. et al. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. **J Virol**, v. 76, n. 7, p. 3482-92, Apr 2002.
- BRILLET, R. et al. The nonstructural 5A protein of hepatitis C virus genotype 1b does not contain an interferon sensitivity-determining region. **J Infect Dis**, v. 195, n. 3, p. 432-41, Feb 1 2007.
- BROWN, E. A. et al. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 19, p. 5041-5, Oct 11 1992.

BUKH, J. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1279-1287 e3, May 2012.

BUKH, J. et al. Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. **J Infect Dis**, v. 201, n. 9, p. 1381-9, May 1 2010.

BURBELO, P. D. et al. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. **J Virol**, v. 86, n. 11, p. 6171-8, Jun 2012.

BUSCH, M. P.; SHAFER, K. A. Acute-phase hepatitis C virus infection: implications for research, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 7, p. 959-61, Apr 1 2005.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 1, p. 41-9, Jan 2005.

CARRERE-KREMER, S. et al. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. **J Virol**, v. 76, n. 8, p. 3720-30, Apr 2002.

CARROLL, S. S. et al. Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p. 926-34, Mar 2009.

CHANG, S. C. et al. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 205, n. 2, p. 1284-90, Dec 15 1994.

CHATTERJI, U. et al. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. **J Biol Chem**, v. 284, n. 25, p. 16998-7005, Jun 19 2009.

CHEENT, K.; KHAKOO, S. I. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. **Gut**, v. 60, n. 2, p. 268-78, Feb 2011.

CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2006.

CHENG, J. C.; CHANG, M. F.; CHANG, S. C. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. **J Virol**, v. 73, n. 8, p. 7044-9, Aug 1999.

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.

CHOO, Q. L. et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 6, p. 2451-5, Mar 15 1991.

CHOU, A. H. et al. Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. **J Immunol**, v. 174, n. 4, p. 2160-6, Feb 15 2005.

CLARKE, A.; KULASEGARAM, R. Hepatitis C transmission -- where are we now? **Int J STD AIDS**, v. 17, n. 2, p. 74-80; quiz 80, Feb 2006.

COCQUEREL, L. et al. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. **J Virol**, v. 72, n. 3, p. 2183-91, Mar 1998.

COCQUEREL, L. et al. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **EMBO J**, v. 21, n. 12, p. 2893-902, Jun 17 2002.

COCQUEREL, L. et al. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. **J Virol**, v. 74, n. 8, p. 3623-33, Apr 2000.

CONNELLY, M. A.; WILLIAMS, D. L. SR-BI and HDL cholesteryl ester metabolism. **Endocr Res**, v. 30, n. 4, p. 697-703, Nov 2004.

CORLESS, L. et al. Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 2, p. 362-72, Feb 2010.

CORMIER, E. G. et al. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 19, p. 7270-4, May 11 2004.

DALAGIORGOU, G. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 6, p. 1343-51, Jun 2011.

DAS, A. T. et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. **J Virol**, v. 78, n. 5, p. 2601-5, Mar 2004.

DAVIS, G. L. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Am J Med**, v. 107, n. 6B, p. 21S-26S, Dec 27 1999.

DE FOUGEROLLES, A. et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 6, p. 443-53, Jun 2007.

DE FRANCESCO, R. et al. RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **Methods Enzymol**, v. 275, p. 58-67, 1996.

DE JONG, Y. P.; RICE, C. M.; PLOSS, A. Evaluation of combination therapy against hepatitis C virus infection in human liver chimeric mice. **J Hepatol**, v. 54, n. 5, p. 848-50, May 2011.

DELEERSNYDER, V. et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. **J Virol**, v. 71, n. 1, p. 697-704, Jan 1997.

DEUTSCH, M.; HADZIYANNIS, S. J. Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. **J Viral Hepat**, v. 15, n. 1, p. 2-11, Jan 2008.

DHIMAN, R. K.; CHAWLA, Y. Acute viral hepatitis C should be treated. **Indian J Gastroenterol**, v. 24, n. 2, p. 68-71, Mar-Apr 2005.

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

DOMINSKA, M.; DYKXHOORN, D. M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 8, p. 1183-9, Apr 15 2010.

DROUIN, C. et al. Cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus (HCV) alternate reading frame protein (ARFP) are undetectable during acute infection. **J Clin Virol**, v. 47, n. 1, p. 102-3, Jan 2010.

DUCOULOMBIER, D. et al. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. **Hepatology**, v. 39, n. 3, p. 817-25, Mar 2004.

DUPUIS, S. et al. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 388-91, Mar 2003.

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.

ELAZAR, M. et al. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. **J Virol**, v. 77, n. 10, p. 6055-61, May 2003.

ELAZAR, M. et al. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. **J Virol**, v. 78, n. 20, p. 11393-400, Oct 2004.

ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-8, May 24 2001.

ENOMOTO, N. et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. **J Clin Invest**, v. 96, n. 1, p. 224-30, Jul 1995.

ENOMOTO, N. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N Engl J Med**, v. 334, n. 2, p. 77-81, Jan 11 1996.

ERDTMANN, L. et al. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 18256-64, May 16 2003.

ERRINGTON, W. et al. Subcellular localisation of NS3 in HCV-infected hepatocytes. **J Med Virol**, v. 59, n. 4, p. 456-62, Dec 1999.

EVANS, M. J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 801-5, Apr 12 2007.

EYRE, N. S.; BAUMERT, T. F.; BEARD, M. R. Closing the gap: the tight junction protein occludin and hepatitis C virus entry. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 1770-2, May 2009.

FAILLA, C.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. **J Virol**, v. 68, n. 6, p. 3753-60, Jun 1994.

FARCI, P. et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 16, p. 7792-6, Aug 2 1994.

FEINSTONE, S. M. et al. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. **Infect Immun**, v. 41, n. 2, p. 816-21, Aug 1983.

FEINSTONE, S. M.; PURCELL, R. H. Non-A, non-B hepatitis. **Annu Rev Med**, v. 29, p. 359-66, 1978.

FELD, J. J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 967-72, Aug 18 2005.

FERRARI, E. et al. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli. **J Virol**, v. 73, n. 2, p. 1649-54, Feb 1999.

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.

FLINT, M.; MCKEATING, J. A. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. **Rev Med Virol**, v. 10, n. 2, p. 101-17, Mar-Apr 2000.

FORNS, X. et al. Characterization of modified hepatitis C virus E2 proteins expressed on the cell surface. **Virology**, v. 274, n. 1, p. 75-85, Aug 15 2000.

FOSTER, T. L. et al. All three domains of the hepatitis C virus nonstructural NS5A protein contribute to RNA binding. **J Virol**, v. 84, n. 18, p. 9267-77, Sep 2010.

FRICK, D. N.; BANIK, S.; RYPMA, R. S. Role of divalent metal cations in ATP hydrolysis catalyzed by the hepatitis C virus NS3 helicase: magnesium provides a bridge for ATP to fuel unwinding. **J Mol Biol**, v. 365, n. 4, p. 1017-32, Jan 26 2007.

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.

FRIEBE, P. et al. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. **J Virol**, v. 79, n. 1, p. 380-92, Jan 2005.

FUKUTOMI, T. et al. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 1096-105, May 2005.

- GALLINARI, P. et al. Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. **J Virol**, v. 72, n. 8, p. 6758-69, Aug 1998.
- GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. **N Engl J Med**, v. 350, n. 11, p. 1118-29, Mar 11 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.
- GERLACH, J. T. et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. **Gastroenterology**, v. 125, n. 1, p. 80-8, Jul 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.
- GITLIN, L.; STONE, J. K.; ANDINO, R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 1027-35, Jan 2005.
- GOH, P. Y. et al. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. **J Virol**, v. 78, n. 10, p. 5288-98, May 2004.
- GONZALEZ-PERALTA, R. P.; DAVIS, G. L.; LAU, J. Y. Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v. 21, n. 2, p. 255-9, Aug 1994.
- GOSERT, R. et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5487-92, May 2003.
- GOTTWEIN, J. M. et al. Development and application of hepatitis C reporter viruses with genotype 1 to 7 core-nonstructural protein 2 (NS2) expressing fluorescent proteins or luciferase in modified JFH1 NS5A. **J Virol**, v. 85, n. 17, p. 8913-28, Sep 2011.
- GRAKOU, A. et al. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. **J Virol**, v. 67, n. 5, p. 2832-43, May 1993a.
- 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 1993b.
- GRAKOU, A. et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. **J Virol**, v. 67, n. 3, p. 1385-95, Mar 1993.
- GREGORY, R. I. et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 631-40, Nov 18 2005.
- GRETTON, S. N.; TAYLOR, A. I.; MCLAUCHLAN, J. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 5, p. 1415-21, May 2005.

GRIFFIN, S. Inhibition of HCV p7 as a therapeutic target. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 2, p. 175-81, Feb 2010.

GRIFFIN, S. et al. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. **Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 1779-90, Dec 2008.

GRIFFIN, S. D. et al. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 2, p. 451-61, Feb 2004.

GU, S.; ROSSI, J. J. Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells. **RNA**, v. 11, n. 1, p. 38-44, Jan 2005.

GUERNIOU, V. et al. Targeted inhibition of the hepatitis C internal ribosomal entry site genomic RNA with oligonucleotide conjugates. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 20, p. 6778-87, 2007.

GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 65-91, 2001.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611-20, May 19 1995.

GUPTA, S.; SINGH, R. Analysis of the virus dynamics model reveals that early treatment of HCV infection may lead to the sustained virological response. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41209, 2012.

HADZIYANNIS, S. J.; KOSKINAS, J. S. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. **Hepatol Res**, v. 29, n. 3, p. 129-135, Jul 2004.

HALEY, B.; ZAMORE, P. D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 7, p. 599-606, Jul 2004.

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.

HAN, J. H. et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 5, p. 1711-5, Mar 1 1991.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11 2002.

HANOULLE, X. et al. The domain 2 of the HCV NS5A protein is intrinsically unstructured. **Protein Pept Lett**, v. 17, n. 8, p. 1012-8, Aug 2010.

HANOULLE, X. et al. Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 381, n. 4, p. 634-8, Apr 17 2009.

HARADA, S. et al. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. **J Virol**, v. 65, n. 6, p. 3015-21, Jun 1991.

HARBORTH, J. et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 24, p. 4557-65, Dec 2001.

HARRIS, D. et al. Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 1006-18, Jun 2006.

HE, L. F. et al. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. **J Infect Dis**, v. 156, n. 4, p. 636-40, Oct 1987.

HECK, J. A.; MENG, X.; FRICK, D. N. Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 7, p. 1173-80, Apr 1 2009.

HIJIKATA, M. et al. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 13, p. 5547-51, Jul 1 1991.

HIJIKATA, M. et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. **J Virol**, v. 67, n. 8, p. 4665-75, Aug 1993.

HIRAGA, N. et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. **FEBS Lett**, v. 581, n. 10, p. 1983-7, May 15 2007.

HOFMANN, W. P.; ZEUZEM, S.; SARRAZIN, C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. **J Clin Virol**, v. 32, n. 2, p. 86-91, Feb 2005.

HOLLINGER, F. B.; EMERSON, S. U. Hepatitis A Virus. In: FIELDS, B. N. et al (Ed.). **Field's Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

HONDA, M. et al. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. **Hepatology**, v. 20, n. 5, p. 1144-51, Nov 1994.

HONDA, M. et al. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. **Virology**, v. 222, n. 1, p. 31-42, Aug 1 1996.

HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S21-9, Nov 2002.

HSU, M. et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 12, p. 7271-6, Jun 10 2003.

HUANG, L. et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. **J Biol Chem**, v. 280, n. 43, p. 36417-28, Oct 28 2005.

HUANG, T. et al. The role of Hepatitis C Virus in the dynamic protein interaction networks of hepatocellular cirrhosis and carcinoma. **Int J Comput Biol Drug Des**, v. 4, n. 1, p. 5-18, 2011.

HUGHES, M. et al. A conserved proline between domains II and III of hepatitis C virus NS5A influences both RNA replication and virus assembly. **J Virol**, v. 83, n. 20, p. 10788-96, Oct 2009.

HUGLE, T. et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. **Virology**, v. 284, n. 1, p. 70-81, May 25 2001.

IVASHKINA, N. et al. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. **J Virol**, v. 76, n. 24, p. 13088-93, Dec 2002.

JAKYMIW, A. et al. Autoimmune targeting of key components of RNA interference. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 4, p. R87, 2006.

JIRASKO, V. et al. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 12, p. e1001233, 2010.

JONES, C. T. et al. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **J Virol**, v. 81, n. 16, p. 8374-83, Aug 2007.

KAMER, G.; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. **Nucleic Acids Res**, v. 12, n. 18, p. 7269-82, Sep 25 1984.

KAPADIA, S. B.; BRIDEAU-ANDERSEN, A.; CHISARI, F. V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 2014-8, Feb 18 2003.

KAPOOR, A. et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 28, p. 11608-13, Jul 12 2011.

KATO, T. et al. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. **Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 732-40, Sep 2008.

KAUKINEN, P. et al. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. **Virol J**, v. 3, p. 66, 2006.

KERSHENOBICH, D. et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. **Liver Int**, v. 31 Suppl 2, p. 18-29, Jul 2011.

KIM, D. H. et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 222-6, Feb 2005.

KIM, D. W. et al. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 1, p. 160-6, Oct 4 1995.

KIM, J. E. et al. Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. **Arch Virol**, v. 144, n. 2, p. 329-43, 1999.

KIM, J. L. et al. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 343-55, Oct 18 1996.

KIM, S. et al. Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. **J Virol**, v. 85, n. 13, p. 6645-56, Jul 2011.

KIMURA, T. et al. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 9, p. 2108-13, Sep 2008.

KNETEMAN, N. M. et al. HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 745-52, Mar 2009.

KNIGHT, S. W.; BASS, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 293, n. 5538, p. 2269-71, Sep 21 2001.

KOLE, R.; KRAINER, A. R.; ALTMAN, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 2, p. 125-40, Feb 2012.

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.

KORF, M. et al. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. **J Hepatol**, v. 43, n. 2, p. 225-34, Aug 2005.

KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C.; CHATZOPOULOS, D. Apoptosis in hepatitis C. **J Viral Hepat**, v. 10, n. 5, p. 335-42, Sep 2003.

KRIEGER, N.; LOHMANN, V.; BARTENSCHLAGER, R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. **J Virol**, v. 75, n. 10, p. 4614-24, May 2001.

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

- KYONO, K.; MIYASHIRO, M.; TAGUCHI, I. Human eukaryotic initiation factor 4AII associates with hepatitis C virus NS5B protein in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 292, n. 3, p. 659-66, Apr 5 2002.
- LASKUS, T. et al. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. **J Infect Dis**, v. 195, n. 1, p. 124-33, Jan 1 2007.
- LASKUS, T. et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. **J Infect Dis**, v. 181, n. 2, p. 442-8, Feb 2000.
- LAVANCHY, D. The global burden of hepatitis C. **Liver Int**, v. 29 Suppl 1, p. 74-81, Jan 2009.
- LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 107-15, Feb 2011.
- LAVIE, M.; GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1-E2 Heterodimer. In: TAN, S. L. (Ed.). **Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology**. Norfolk (UK), 2006.
- LEE, C. M. et al. Hepatitis C virus genotypes in southern Taiwan: prevalence and clinical implications. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 8, p. 767-74, Aug 2006.
- LEE, H. et al. cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. **J Virol**, v. 78, n. 20, p. 10865-77, Oct 2004.
- LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **N Engl J Med**, v. 337, n. 24, p. 1733-45, Dec 11 1997.
- LEHMANN, M. et al. High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. **J Med Virol**, v. 73, n. 3, p. 387-91, Jul 2004.
- LESBURG, C. A. et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 10, p. 937-43, Oct 1999.
- LESCAR, J. et al. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 137-48, Apr 6 2001.
- LEUSCHNER, P. J. et al. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. **EMBO Rep**, v. 7, n. 3, p. 314-20, Mar 2006.
- LI, X. D. et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 49, p. 17717-22, Dec 6 2005.

- LIAN, S. et al. GW bodies, microRNAs and the cell cycle. **Cell Cycle**, v. 5, n. 3, p. 242-5, Feb 2006.
- LIANG, Y. et al. Domain 2 of nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus is natively unfolded. **Biochemistry**, v. 46, n. 41, p. 11550-8, Oct 16 2007.
- LIN, C. et al. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. **J Virol**, v. 68, n. 8, p. 5063-73, Aug 1994.
- LIN, C.; RICE, C. M. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7622-6, Aug 15 1995.
- LINDENBACH, B. D. et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 10, p. 3805-9, Mar 7 2006.
- LINDENBACH, B. D. et al. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. **J Virol**, v. 81, n. 17, p. 8905-18, Sep 2007.
- 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.
- LIU, J. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1437-41, Sep 3 2004.
- LIU, Q. et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1921-5, Sep 26 2003.
- LOHMANN, V. et al. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. **J Virol**, v. 75, n. 3, p. 1437-49, Feb 2001.
- LOHMANN, V. et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**, v. 285, n. 5424, p. 110-3, Jul 2 1999.
- LORENZ, I. C. et al. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 831-5, Aug 17 2006.
- LOVE, R. A. et al. Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. **J Virol**, v. 83, n. 9, p. 4395-403, May 2009.
- LUIK, P. et al. The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12712-6, Aug 4 2009.
- LUNDIN, M. et al. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 11, p. 3263-72, Nov 2006.

LUNDIN, M. et al. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5428-38, May 2003.

LY, K. N. et al. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the United States between 1999 and 2007. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 4, p. 271-8, Feb 21 2012.

LYRA, A. C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A. M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 5, p. 691-5, May 2004.

MA, Y. et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. **J Virol**, v. 85, n. 1, p. 86-97, Jan 2011.

MA, Y. et al. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. **J Virol**, v. 82, n. 15, p. 7624-39, Aug 2008.

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.

MAHESHWARI, A.; RAY, S.; THULUVATH, P. J. Acute hepatitis C. **Lancet**, v. 372, n. 9635, p. 321-32, Jul 26 2008.

MARCELLIN, P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. **J Hepatol**, v. 31 Suppl 1, p. 9-16, 1999.

MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S47-56, Nov 2002.

MARTIN, A.; LEMON, S. M. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S164-72, Feb 2006.

MASAKI, T. et al. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. **J Virol**, v. 82, n. 16, p. 7964-76, Aug 2008.

MATEU, G. et al. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. **Virology**, v. 376, n. 2, p. 397-407, Jul 5 2008.

MATRANGA, C. et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 607-20, Nov 18 2005.

MATSUURA, Y. et al. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 141-50, Nov 15 1994.

MCHUTCHISON, J. G. et al. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. **N Engl J Med**, v. 361, n. 6, p. 580-93, Aug 6 2009.

MCHUTCHISON, J. G. et al. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. **N Engl J Med**, v. 362, n. 14, p. 1292-303, Apr 8 2010.

MCLAUCHLAN, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. **J Viral Hepat**, v. 7, n. 1, p. 2-14, Jan 2000.

MERCER, D. F. et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 927-33, Aug 2001.

MEULEMAN, P. et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. **Hepatology**, v. 41, n. 4, p. 847-56, Apr 2005.

MEYER, K. et al. Inhibition of hepatitis C virus core protein expression in immortalized human hepatocytes induces cytochrome c-independent increase in Apaf-1 and caspase-9 activation for cell death. **Virology**, v. 336, n. 2, p. 198-207, Jun 5 2005.

MINUTELLO, M. A. et al. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4⁺ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. **J Exp Med**, v. 178, n. 1, p. 17-25, Jul 1 1993.

MIZUSHIMA, H. et al. Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2. **J Virol**, v. 68, n. 4, p. 2731-4, Apr 1994.

MORICE, Y. et al. Seroconversion to hepatitis C virus alternate reading frame protein during acute infection. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 1449-59, May 2009.

MORIYA, K. et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. **Nat Med**, v. 4, n. 9, p. 1065-7, Sep 1998.

MULLER, H. M. et al. B-lymphocytes are predominantly involved in viral propagation of hepatitis C virus (HCV). **Arch Virol Suppl**, v. 9, p. 307-16, 1994.

MURAO, K. et al. Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class BI, a possible HCV receptor in hepatocytes. **Gut**, v. 57, n. 5, p. 664-71, May 2008.

MUSHAHWAR, I. K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. **J Med Virol**, v. 80, n. 4, p. 646-58, Apr 2008.

NAPOLI, J. et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Hepatology**, v. 24, n. 4, p. 759-65, Oct 1996.

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

NIELSEN, S. U. et al. Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 6, p. 1497-507, Jun 2004.

NIELSEN, S. U. et al. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. **J Virol**, v. 80, n. 5, p. 2418-28, Mar 2006.

NOMURA-TAKIGAWA, Y. et al. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 7, p. 1935-45, Jul 2006.

NUNEZ, O. et al. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1665-72, Nov 2004.

OP DE BEECK, A. et al. Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. **J Virol**, v. 78, n. 6, p. 2994-3002, 2004.

PADDISON, P. J. et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. **Genes Dev**, v. 16, n. 8, p. 948-58, Apr 15 2002.

PAVIO, N.; LAI, M. M. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? **J Biosci**, v. 28, n. 3, p. 287-304, Apr 2003.

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

PAWLOTSKY, J. M. et al. Significance of anti-hepatitis C virus core IgM antibodies in patients with chronic hepatitis C. **J Med Virol**, v. 47, n. 3, p. 285-91, Nov 1995.

PEARLMAN, B. L. Protease inhibitors for the treatment of chronic hepatitis C genotype-1 infection: the new standard of care. **Lancet Infect Dis**, v. 12, n. 9, p. 717-28, Sep 2012.

PENIN, F. et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem**, v. 279, n. 39, p. 40835-43, Sep 24 2004.

PENIN, F. et al. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. **J Virol**, v. 75, n. 12, p. 5703-10, Jun 2001.

PHAN, T. et al. Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. **J Virol**, v. 83, n. 17, p. 8379-95, Sep 2009.

PICCININNI, S. et al. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 45670-9, Nov 22 2002.

PICHU, S. et al. Dicer-substrate siRNA inhibits tumor necrosis factor alpha secretion in Kupffer cells in vitro: in vivo targeting of Kupffer cells by siRNA-liposomes. **Pharmacol Res**, v. 65, n. 1, p. 48-55, Jan 2012.

- PIERONI, L. et al. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. **J Virol**, v. 71, n. 9, p. 6373-80, Sep 1997.
- 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.
- PIETSCHMANN, T. et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. **J Virol**, v. 76, n. 8, p. 4008-21, Apr 2002.
- PILERI, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, n. 5390, p. 938-41, Oct 30 1998.
- PLOSS, A.; RICE, C. M. Towards a small animal model for hepatitis C. **EMBO Rep**, v. 10, n. 11, p. 1220-7, Nov 2009.
- POCH, O. et al. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. **EMBO J**, v. 8, n. 12, p. 3867-74, Dec 1 1989.
- POYNARD, T. et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v. 352, n. 9138, p. 1426-32, Oct 31 1998.
- PREALL, J. B. et al. Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in *Drosophila*. **Curr Biol**, v. 16, n. 5, p. 530-5, Mar 7 2006.
- PREALL, J. B.; SONTHEIMER, E. J. RNAi: RISC gets loaded. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 543-5, Nov 18 2005.
- PURCELL, R. H.; ALTER, H. J.; DIENSTAG, J. L. Non-A, non-B hepatitis. **Yale J Biol Med**, v. 49, n. 3, p. 243-50, Jul 1976.
- QIN, W. et al. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 3, p. 2132-7, Jan 18 2002.
- QUINKERT, D.; BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. **J Virol**, v. 79, n. 21, p. 13594-605, Nov 2005.
- RANDALL, G.; GRAKOU, A.; RICE, C. M. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 1, p. 235-40, Jan 7 2003.
- 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.
- RAY, R. B. et al. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. **Virus Res**, v. 37, n. 3, p. 209-20, Aug 1995.

REALDI, G. et al. Long-term follow-up of acute and chronic non-A, non-B post-transfusion hepatitis: evidence of progression to liver cirrhosis. **Gut**, v. 23, n. 4, p. 270-5, Apr 1982.

REYNOLDS, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 3, p. 326-30, Mar 2004.

REYNOLDS, J. E. et al. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. **EMBO J**, v. 14, n. 23, p. 6010-20, Dec 1 1995.

RIZZETTO, M. et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut**, v. 18, n. 12, p. 997-1003, Dec 1977.

ROCCASECCA, R. et al. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. **J Virol**, v. 77, n. 3, p. 1856-67, Feb 2003.

ROSA, D. et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 5, p. 1759-63, Mar 5 1996.

RUSTGI, V. K. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. **J Gastroenterol**, v. 42, n. 7, p. 513-21, Jul 2007.

SAKAI, A. et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11646-51, Sep 30 2003.

SANTOLINI, E. et al. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. **J Virol**, v. 69, n. 12, p. 7461-71, Dec 1995.

SAPAY, N. et al. NMR structure and molecular dynamics of the in-plane membrane anchor of nonstructural protein 5A from bovine viral diarrhea virus. **Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 2221-33, Feb 21 2006.

SARHAN, M. A. et al. Patient-derived hepatitis C virus and JFH-1 clones differ in their ability to infect human hepatoma cells and lymphocytes. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 11, p. 2399-407, Nov 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.

SCHMIDT-MENDE, J. et al. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 47, p. 44052-63, Nov 23 2001.

SCHREGEL, V. et al. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5342-7, Mar 31 2009.

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, Oct 17 2003.

SCHWER, B. et al. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. **J Virol**, v. 78, n. 15, p. 7958-68, Aug 2004.

SEN, G. L.; WEHRMAN, T. S.; BLAU, H. M. mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage. **Differentiation**, v. 73, n. 6, p. 287-93, Jul 2005.

SERAFINO, A. et al. Ultrastructural observations of viral particles within hepatitis C virus-infected human B lymphoblastoid cell line. **Res Virol**, v. 148, n. 2, p. 153-9, Mar-Apr 1997.

SEREBROV, V.; PYLE, A. M. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 476-80, Jul 22 2004.

SHESHEER KUMAR, M. et al. Expression of alternate reading frame protein (F1) of hepatitis C virus in Escherichia coli and detection of antibodies for F1 in Indian patients. **Infect Genet Evol**, v. 8, n. 3, p. 374-7, May 2008.

SHIH, C. M. et al. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. **J Virol**, v. 67, n. 10, p. 5823-32, Oct 1993.

SHIROTA, Y. et al. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. **J Biol Chem**, v. 277, n. 13, p. 11149-55, Mar 29 2002.

SIMISTER, P. et al. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. **J Virol**, v. 83, n. 22, p. 11926-39, Nov 2009.

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

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

SONG, E. et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. **Nat Med**, v. 9, n. 3, p. 347-51, Mar 2003.

SOZA, A.; RIQUELME, A.; ARRESE, M. Routes of transmission of hepatitis C virus. **Ann Hepatol**, v. 9 Suppl, p. 33, 2010.

STAPLEFORD, K. A.; LINDENBACH, B. D. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. **J Virol**, v. 85, n. 4, p. 1706-17, Feb 2011.

STAPLETON, J. T. et al. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 2, p. 233-46, Feb 2011.

STEENBERGEN, R. H. et al. Lipoprotein profiles in SCID/uPA mice transplanted with human hepatocytes become human-like and correlate with HCV infection success. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, n. 4, p. G844-54, Oct 2010.

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.

STEMPNIAK, M. et al. The NS3 proteinase domain of hepatitis C virus is a zinc-containing enzyme. **J Virol**, v. 71, n. 4, p. 2881-6, Apr 1997.

STGELAIS, C. et al. Inhibition of hepatitis C virus p7 membrane channels in a liposome-based assay system. **Antiviral Res**, v. 76, n. 1, p. 48-58, Oct 2007.

SUZICH, J. A. et al. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. **J Virol**, v. 67, n. 10, p. 6152-8, Oct 1993.

SUZUKI, R. et al. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. **J Gen Virol**, v. 76 (Pt 1), p. 53-61, Jan 1995.

SUZUKI, R. et al. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 1271-81, Jan 2005.

SVITKIN, Y. V. et al. Complete translation of the hepatitis C virus genome in vitro: membranes play a critical role in the maturation of all virus proteins except for NS3. **J Virol**, v. 79, n. 11, p. 6868-81, Jun 2005.

TABARA, H. et al. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. **Cell**, v. 109, n. 7, p. 861-71, Jun 28 2002.

TABOR, E. et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. **Lancet**, v. 1, n. 8062, p. 463-6, Mar 4 1978.

TAI, C. L. et al. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). **J Virol**, v. 70, n. 12, p. 8477-84, Dec 1996.

TANAKA, T. et al. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 2, p. 744-9, Oct 13 1995.

TANAKA, T. et al. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. **J Virol**, v. 70, n. 5, p. 3307-12, May 1996.

TELLINGHUISEN, T. L.; FOSS, K. L.; TREADAWAY, J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000032, Mar 2008.

TELLINGHUISEN, T. L. et al. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 48576-87, Nov 19 2004.

TELLINGHUISEN, T. L.; MARCOTRIGIANO, J.; RICE, C. M. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. **Nature**, v. 435, n. 7040, p. 374-9, May 19 2005.

THIBEAULT, D. et al. In vitro characterization of a purified NS2/3 protease variant of hepatitis C virus. **J Biol Chem**, v. 276, n. 49, p. 46678-84, Dec 7 2001.

THOMAS, D. L. et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. **JAMA**, v. 284, n. 4, p. 450-6, Jul 26 2000.

THOMAS, S. L. et al. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. **Int J Epidemiol**, v. 27, n. 1, p. 108-17, Feb 1998.

TOMEI, L. et al. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. **J Virol**, v. 67, n. 7, p. 4017-26, Jul 1993.

TSUKIYAMA-KOHARA, K. et al. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. **J Virol**, v. 66, n. 3, p. 1476-83, Mar 1992.

TUMBAN, E.; PAINTER, J. M.; LOTT, W. B. Comparison between the HCV IRES domain IV RNA structure and the Iron Responsive Element. **J Negat Results Biomed**, v. 8, p. 4, 2009.

UI-TEI, K. et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 3, p. 936-48, 2004.

VERSTREPEN, B. E. et al. Clearance of genotype 1b hepatitis C virus in chimpanzees in the presence of vaccine-induced E1-neutralizing antibodies. **J Infect Dis**, v. 204, n. 6, p. 837-44, Sep 15 2011.

VILLANO, S. A. et al. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 908-14, Mar 1999.

VOISSET, C. et al. High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. **J Biol Chem**, v. 280, n. 9, p. 7793-9, Mar 4 2005.

VOLPE, T. et al. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. **Chromosome Res**, v. 11, n. 2, p. 137-46, 2003.

VON HAHN, T. et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. **Hepatology**, v. 43, n. 5, p. 932-42, May 2006.

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.

WALEWSKI, J. L. et al. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. **RNA**, v. 7, n. 5, p. 710-21, May 2001.

WANG, C. et al. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. **RNA**, v. 1, n. 5, p. 526-37, Jul 1995.

WANG, X. H. et al. Progression of fibrosis during chronic hepatitis C is associated with rapid virus evolution. **J Virol**, v. 81, n. 12, p. 6513-22, Jun 2007.

WARDELL, A. D. et al. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. **J Gen Virol**, v. 80 (Pt 3), p. 701-9, Mar 1999.

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.

WEDEMEYER, H.; MANNING, M. P. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2010.

WEINER, A. J. et al. Sequence variation in hepatitis C viral isolates. **J Hepatol**, v. 13 Suppl 4, p. S6-14, 1991.

WELBOURN, S. et al. Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. **J Biol Chem**, v. 280, n. 33, p. 29604-11, Aug 19 2005.

WILSON, J. A. et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5, p. 2783-8, Mar 4 2003.

WISE, M. et al. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States, 1995-2004. **Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 1128-35, Apr 2008.

WOLK, B. et al. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. **J Virol**, v. 74, n. 5, p. 2293-304, Mar 2000.

WOZNIAK, A. L. et al. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 9, p. e1001087, 2010.

XU, Z. et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. **EMBO J**, v. 20, n. 14, p. 3840-8, Jul 16 2001.

YAMASHITA, T. et al. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15479-86, Jun 19 1998.

- YAN, Y. et al. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. **Protein Sci**, v. 7, n. 4, p. 837-47, Apr 1998.
- YASUI, K. et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. **J Virol**, v. 72, n. 7, p. 6048-55, Jul 1998.
- YI, M.; LEMON, S. M. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. **J Virol**, v. 77, n. 6, p. 3557-68, Mar 2003.
- YI, M. et al. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. **J Virol**, v. 81, n. 2, p. 629-38, Jan 2007.
- YI, M. et al. Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000403, May 2009.
- YI, M. et al. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2310-5, Feb 14 2006.
- 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.
- ZEISEL, M. B. et al. Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. **Front Biosci**, v. 14, p. 3274-85, 2009.
- ZHANG, H. et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. **EMBO J**, v. 21, n. 21, p. 5875-85, Nov 1 2002.
- ZHANG, J. et al. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. **Virology**, v. 320, n. 1, p. 135-43, Mar 1 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.
- ZHOU, J. et al. Functional in vivo delivery of multiplexed anti-HIV-1 siRNAs via a chemically synthesized aptamer with a sticky bridge. **Mol Ther**, v. 21, n. 1, p. 192-200, Jan 2013.
- ZIBERT, A. et al. Characterization of antibody response to hepatitis C virus protein E2 and significance of hypervariable region 1-specific antibodies in viral neutralization. **Arch Virol**, v. 142, n. 3, p. 523-34, 1997.

Capítulo IV

4. Material e métodos

4.1. Bactérias e plasmídeos

4.1.1. Linhagens bacterianas

Escherichia coli (E. coli) DH5 α – Genótipo: F Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK $^-$, mK $^+$) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1 (Life Technologies). Linhagem utilizada para experimentos de clonagem e aumento da massa de DNA plasmídeos.

E. Coli DB3.1 – Genótipo: F $^-$ gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB $^-$, mB $^-$) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ^- leu mtl1 (Life Technologies). Linhagem utilizada para crescimento de plasmídeo contendo o gene letal ccdB.

4.1.2. Plasmídeos e vetores de expressão

Replicon SGR-JFH-1 – Replicon subgenômico contendo sequência codificante do HCV (NS3-3' UTR). Esta construção possui o gene de resistência à neomicina (neo R) o que permite a criação de linhagens celulares estáveis e o gene de resistência à ampicilina para auxiliar à sua propagação em bactérias. Esta construção foi desenvolvida pelo Dr. T Kato (Kato et al., 2003) e doada pelo Dr. T. Wakita, National Institute of Infectious Diseases, Tóquio, Japão.

Replicon pJFH-1 – Replicon genômico contendo a sequência completa do HCV genótipo 2a isolado JFH-1 (5' UTR – 3' UTR). Este replicon é utilizado para a produção de partículas infecciosas do HCV derivadas de cultura de células (HCVcc). Construção desenvolvida e doada pelo Dr. T. Wakita.

Replicon SGR-FEO-JFH-1 – Construção bicistrônica contendo sequência codificante do HCV (NS3-3' UTR) e o gene repórter *firefly luciferase* fundido ao gene da resistência à

neomicina (FEO). Este plasmídeo permite a criação de linhagem celular estável que expressa o gene repórter da luciferase. Os níveis de luciferase estão intimamente relacionados à expressão da construção viral (WYLES et al., 2009). Esta construção foi desenvolvida e doada pelo Dr. D. Wyles da University of California, California, EUA.

Replicon FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi – É um sistema monocistrônico quimérico contendo sequências do vírus HCV genótipo 2a isolado J6 (5' UTR – NS2) e vírus HCV genótipo 2a isolado JFH-1 (NS2 – 3' UTR). O gene repórter da *renilla luciferase* foi inserido no início da sequência codificante da proteína Core do HCV (TSCHERNE et al., 2006). Este replicon é utilizado para a produção de HCVcc. Construção adquirida junto a empresa Apath LLC, NY, EUA.

pENTR4-H1(Riken BRC) – Vetor de entrada (doador) para o sistema de clonagem Gateway® (Life technologies). Este plasmídeo possui flanqueando o sítio de clonagem os genes attL1 e attL2 utilizados pelo sistema Gateway® para a transferência de fragmentos entre plasmídeos por recombinação. Este plasmídeo foi utilizado para a clonagem inicial da sequência de shRNA a ser utilizada no sistema lentiviral.

CS-RfA-EG (Riken BRC) – Vetor de expressão lentiviral. Nesta construção estão incluídos os promotores virais, de expressão do shRNA e o gene repórter GFP.

pCAG-HIVgp (Riken BRC) – Plasmídeo de empacotamento do Sistema lentiviral, todos os genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu*, and *nef*) e regulatórios (*tat* and *rev*) do vírus foram removidos. Estão presentes nesta construção apenas os genes estruturais *gag* e *pol*.

pCMV-VSV-G-RSV-Rev (Riken BRC) – Plasmídeo de empacotamento do Sistema lentiviral contendo o gene *Rev* do HIV. Esta construção auxilia na transferência do material genômico produzido pelo vetores lentivirais do núcleo para o citoplasma, facilitando a montagem das partículas infecciosas.

4.2. Anticorpos

Os anticorpos descritos abaixo foram utilizados em pelo menos um ponto deste trabalho. As concentrações indicadas são em relação à diluição inicial distribuída pelo fabricante.

- Anti-NS5A: anticorpo policlonal produzido em ovelhas a partir de proteínas recombinantes (MACDONALD et al., 2003). Para ensaios de western blot foi utilizado na diluição de 1:10000, para imunofluorescência 1:1000. Gentilmente cedido pelo Dr. Mark Harris, University of Leeds, Reino Unido.

- Anti-NS3 produzido em rato: anticorpo monoclonal primário produzido em rato (Abcam - ab65407). Para ensaio de western blot foi usada a diluição de 1:5000

- Anti-GAPDH: anticorpo primário monoclonal produzido em rato (Abcam - ab8245). Utilizado na diluição de 1:10000 para western blot.

- Anti-IgG de rato HRP: anticorpo secundário policlonal conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) produzido em rato (Abcam - ab6728). Para western blot usado na diluição de 1:10000.

- Alexa 594 Anti-IgG de ovelha: anticorpo secundário policlonal conjugado com a molécula fluorescente Alexa Fluor® 598 (Life Technologies - A11016). Utilizado na diluição de 1:500.

4.3. Manipulação de DNA

4.3.1. Sequência padrão do HCV

A sequência padrão do HCV genótipo 2a isolado JFH-1 foi obtida do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a partir do número de acesso AB047639. Esta sequência foi utilizada no desenvolvimento dos primers e de DsiRNA utilizadas neste projeto.

4.3.2. Primers

Todos os primers utilizados neste trabalho foram produzidos por Sigma-Aldrich. Ao serem recebidos no laboratório, quando liofilizados, eram ressuspensos em ddH₂O autoclavada na concentração de 100 µM e estocados em freezer -20 °C. Para evitar ciclos de congelamento e descongelamento, uma diluição intermediária à 10 µM era utilizada nas reações de PCR.

4.3.3. Síntese de DNA complementar

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit de transcrição reversa *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific). Em um tubo de PCR, aproximadamente 500 ng de cada amostra de RNA era misturado com 4 µL de *5x Reaction Mix* (solução tampão, dNTPs, oligo (dT) e primers randômicos), 2 µL de *2x Maxima Enzyme Mix* (*Maxima Reverse Transcriptase* e *Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor*) e água até o volume final de 20 µL. As amostras eram posteriormente levadas à um termociclador onde eram aquecidas à 25 °C por 10 minutos e 50 °C por 30 minutos. Ao fim dos 30 minutos as amostras eram removidas do termociclador e estocadas em freezer -20 °C até uso posterior.

4.3.4. Polymerase chain reaction (PCR)

A PCR foi utilizada para a amplificação de fragmentos para reação de sequenciamento, confirmação da identidade de linhagem estável e plasmídeos recebidos de outros laboratórios. Para os ensaios de PCR de rotina (aquelas que em que não foi necessário a utilização de enzimas de alta fidelidade) foi utilizada a enzima *Taq DNA Polymerase recombinant* (Thermo Scientific). Uma reação de 50 µL consistia em: 5 µL de 10x Taq Buffer (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 0.8% (v/v) Nonidet P40), 5 µL de dNTPs (Life Technologies – 2 mM), 1 µL de cada primer apropriado (10 µM), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de amostra (cDNA ou plasmídeo), 1.25U da Taq DNA Polimerase e água até completar o volume de 50 µL. As amostras foram submetidas à um programa de ciclagem no termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (Life Technologies) utilizando as seguintes condições: 95 °C por 1 minuto (desnaturação inicial) seguido de 40 ciclos de

95 °C por 30 segundos, 55 °C (a temperatura de anelamento era ajustada de acordo com o par de primer utilizado, $T_M - 5$ °C) por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto (o tempo era ajustado de acordo com o tamanho esperado do fragmento, 1 minuto por cada 1 kb de extensão) e uma extensão final à 72 °C por 5 minutos.

Para ensaios onde foram necessários uma DNA polimerase de alta fidelidade (sequenciamento) foi utilizada a enzima *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Em uma reação de 50 µL eram incluídos: 10 µL de 5x *Phusion HF Buffer* (fórmula não especificada), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada primer (10 uM), 2 µL de cDNA, 1,5 µL de DMSO, 0,5 µL da DNA Polimerase e água até completar o volume de 50 µL. Em um termociclador *Veriti*® as amostras foram submetidas à seguinte ciclagem: 98 °C por 30 segundos para desnaturação inicial seguida de 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 60 °C por 20 segundos (temperatura de anelamento era ajustada conforme o par de primer utilizando, $T_M - 1$ °C), 72 °C por 15 segundos (tempo de extensão ajustado conforme o tamanho previsto do fragmento, 20 segundos/kb) e uma extensão final à 72 °C por 5 minutos.

4.3.5. PCR de colônia

As colônias obtidas na placa de ágar após a reação de ligação e transformação em *E. Coli* (tópico 4.4.2) foram submetidas a uma reação de PCR semelhante à descrita na sessão anterior. Cada colônia era coletada com uma ponteira e era parcialmente transferida para uma outra placa, o restante da colônia era transferido diretamente para o tubo de PCR contendo a mix de reação com os primers apropriados.

4.3.6. Purificação de produtos de PCR

Produtos de PCR foram purificados por extração com fenol-clorofórmio. Foi adicionado ao produto da reação de PCR fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 – Sigma Aldrich) na proporção 1:1 (v/v) e em seguida a mistura foi agitada em um vórtex, seguida de centrifugação à 17 000 xg por cinco minutos. A fase superior (aquosa) foi transferida para um novo tubo e o mesmo volume de clorofórmio foi adicionado ao tubo. Procedeu-se uma nova centrifugação nas mesmas condições acima e novamente a fase

superior foi coletada e transferida para outro tubo. Por fim foi feita a precipitação do DNA da amostra com etanol (sessão 4.3.10).

4.3.7. Digestão do DNA com enzima de restrição

Plasmídeos ou produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição com diferentes objetivos. As reações de digestão foram feitas em tubos de PCR utilizando os tampões e tempos de incubação recomendados pelo fabricante da enzima. Em digestões diagnósticas, era utilizado 1 µg do DNA a ser testado e incubação por 2 h. Para reações de linearização e/ou remoção de insertos de plasmídeos, era utilizado 10 µg do plasmídeo e incubações de 16 h.

4.3.8. Eletroforese de gel de agarose

A análise do DNA era feita por meio da separação dos fragmentos em gel de agarose 0,8% (p/v). A agarose era diluída no volume apropriado de tampão TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) e aquecida até ser completamente dissolvida. Posteriormente a mistura era resfriada brevemente, misturada com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma Aldrich) e transferida para a forma de montagem. Após a polimerização do gel, as amostras de DNA eram misturadas com tampão de amostra (5 % (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 0.025 % (p/v) Laranja G) e aplicadas no gel. Em uma cuba de eletroforese era aplicada ao gel uma voltagem 90 V (8v/cm de distância de cada eletrodo) por aproximadamente 1 hora. Paralelamente às amostras foi adicionado um padrão de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder – Thermo Scientific) para medição aproximada do tamanho DNA. O DNA era visualizado utilizando um transiluminador de luz UV e quando necessário a imagem era digitalizada.

4.3.9. Purificação de DNA em gel de acrilamida

Para a purificação de oligos, foi utilizado a purificação em gel de acrilamida, para isto, placas de vidro que servem de molde para o gel foram limpas de com etanol 70% (v/v) para eliminação de resíduos de detergente ou partículas sólidas. O gel foi preparado a partir da mistura de 15 % de acrilamida contendo 0.35 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % (p/v)

persulfato de amônia (APS), 0.01 % (v/v) e N,N,N',N'-Tetramethylenediamine (TEMED). A mistura do gel foi adicionada ao molde de vidro e o pente separador de amostras encaixado. Após a polimerização do gel, o molde de vidro foi transferido para o tanque de eletroforese contendo tampão TAE. As amostras foram misturadas com tampão de amostra e aplicadas no gel. A eletroforese foi feita a uma voltagem de 70 v por aproximadamente 90 minutos. Ao fim da corrida, o molde de vidro foi removido e o gel de acrilamida foi incubado em uma solução de TAE 0,5% (v/v) de brometo de etídeo por 10 minutos. O gel foi lavado duas vezes em ddH₂O e visualizado em transiluminado de luz UV. As bandas de interesse foram excisadas com um bisturi e transferidas para um tubo contendo 100 µL de tampão tris (pH 8). Com o auxílio de uma ponteira, o gel contendo as bandas de interesse foi macerado e o tubo incubado por 16 horas à 4 °C para a diálise da amostra. Por fim, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante transferido para um novo tubo

4.3.10. Precipitação com Etanol

A precipitação do DNA de solução aquosas era feita por meio da adição de 0,1% (v/v) de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e dois volumes de 100% etanol. Em seguida a amostra era misturada e incubada à -80 °C por 30 minutos. Posteriormente centrifugou-se a amostra à 17 000 xg por 10 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v), seguida de nova centrifugação e remoção do sobrenadante. Após breve secagem à temperatura ambiente, o precipitado era ressuspensionado em ddH₂O.

4.3.11. Ligação de fragmentos de DNA

Para evitar religação todos os vetores, após a digestão com enzima de restrição, eram tratados com *Antarctic Phosphatase* antes da reação de ligação. O inserto (produto de PCR ou extraído de outro plasmídeo) foi ligado ao vetor utilizando 1 U de T4 DNA Ligase (Life Technologies), tampão da enzima (5x; 250 mM Tris-HCl (PH 7.6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 50 % (v/v) glicerol, and 25 % (p/v) PEG-8000) e uma razão molar de 1:3 (inserto/vetor). As reações eram incubadas à 4 °C por 16 h e 1 µL da mistura era utilizada para transformação de bactérias quimiocompetentes (tópico 4.4.2).

4.3.12. Sequenciamento

Para a realização da reação de sequenciamento, 4 µL do produto de PCR purificado foi colocado em um tubo/placa de PCR. Para desnaturação os produtos eram aquecidos por 10 minutos à 95 °C e posteriormente incubados no gelo por dois minutos. Após o resfriamento da amostra, era adicionado em cada amostra 6 µL de mix de sequenciamento contendo 2 µL de BigDye Ready Reaction Mix, 2 µL de BigDye Sequencing Buffer, 1 µL de Primer (5 uM) e 1 µL de ddH₂O. Em um termociclador *Veriti*® as amostras foram submetidas à seguinte ciclagem: desnaturação inicial à 96 °C por um minuto seguida de 25 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por quatro minutos. Para a remoção de dNTPs e primers não incorporados, o DNA foi precipitado utilizando o protocolo descrito na sessão 4.3.10. Por fim 10 µL de Hi-Di™ Formamide foi adicionado em cada orifício da placa contendo amostra. Os produtos foram sequenciados em um sequenciador ABI 3130XL Sequencer (Life technologies).

4.3.13. Anelamento de primers

Para montagem da fita dupla de DNA, utilizado na montagem do vetor viral de shRNA, foram sintetizados dois primers com sequencias complementares em sua região central. Os primers liofilizados foram ressuspensos em ddH₂O na mesma concentração e volumes iguais (e equimolares) de cada primer foram misturados em tubo de 1,5 mL. O tubo foi aquecido à 95 °C por 5 minutos e deixados esfriar lentamente por 60 minutos à temperatura ambiente.

Para a utilização do duplex em uma reação de ligação, foi necessário a fosforilação das extremidades destas moléculas. Para isto foi utilizada a enzima T4 Polynucleotide Kinase (NEB), 1x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer e 10 uM do duplex. A reação foi aquecida à 37 °C por 90 minutos e a enzima desnaturada ao aquecer o tubo à 65 °C por 20 minutos. O duplex anelado e fosforilado foi finalmente purificado em gel de poliacrilamida (PAGE).

4.3.14. Sistema gateway

A técnica de clonagem utilizando o sistema Gateway® é baseada na recombinação sítio-específica de uma bacteriófago lambda que permite uma forma eficiente de transferir sequência de DNAs entre vetores. Em um tubo, 100 ng da construção doadora (gene de interesse flanqueado pelos genes attL) é misturada com 150 ng da construção receptora (gene letal ccdB flanqueado por genes recombinantes attR), 2 µL de LR Clonase II (Life Technologies) e ddH₂O até o volume final de 10 µL. A reação foi incubada à 25 °C por 1 hora e posteriormente 1 µL de Proteinase K foi adicionado para inibição da enzima clonase seguida de aquecimento à 37 °C por 10 minutos. O produto da reação de clonase pode ser utilizado diretamente na reação de transformação (sessão 4.4.2).

4.4. Preparação de DNA plasmidial de cultura de bactérias

4.4.1. Bactérias Z competentes (quimiocompetentes)

Para produção das bactérias Z competentes, uma colônia da bactéria *E. Coli* cepa DH5α foi crescida em 10 mL de meio bacteriano SOC (2% tripton (p/v), 0.5% extrato de levedura (p/v), 10 mM cloreto de sódio, 2.5 mM cloreto de potássio, 10 mM cloreto de magnésio, 10 mM sulfato de magnésio e 20 mM glicose) por 16 h à 37 °C. Quinhentos mililitros de meio SOC foi inoculado com 5 mL da bactéria crescida no dia anterior e incubado à 20 °C sob agitação até que se chegasse ao OD_{600nm} de 0,4 – 0,6 (aproximadamente 10h). As bactérias foram transferidas para o gelo por 10 minutos e precipitadas por centrifugação à 2500 x g por 10 minutos e 4 °C . Para a competência bacteriana foi utilizado o Z-Competent™ *E. coli* Transformation Kit & Buffer Set (Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o precipitado bacteriano foi ressuscitado com 5 mL do tampão de lavagem gelado 1x, as bactérias foram novamente precipitadas e ressuscitadas em 5 mL tampão de competência gelado 1 x. A suspensão foi separada em alíquotas de 50-100 µL e rapidamente congeladas com N₂ líquido ou gelo seco e armazenadas à -80 °C até uso posterior.

4.4.2. Transformação de bactérias quimiocompetentes

Alíquotas de 50 μL das bactérias *E. Coli* Dh5 α Z competentes foram descongeladas, misturadas imediatamente com 1 – 50 ng de DNA plasmidial ou 1 μL da reação de ligação e incubadas em gelo por cinco minutos. Para construções contendo o gene de resistência à ampicilina, após a incubação as bactérias foram transferidas para placas petri contendo ágar LB sólido com o antibiótico de seleção na concentração apropriada e incubadas em estufa bacteriológica à 30-37 °C por 24-48 h. Em construções contendo o gene de resistência à canamicina após a incubação no gelo por cinco minutos, foi adicionado às bactérias 300 μL de meio LB líquido e o tubo incubado sob agitação por 1 h à 30-37 °C. Após a incubação inicial as bactérias foram transferidas para a placa de LB sólida contendo o antibiótico de seleção apropriado e incubadas em estufa bacteriológica à 30-37 °C por 24 - 48 h.

4.4.3. Crescimento de bactérias

Uma única colônia de bactérias *E. coli* Dh5 α transformadas foi utilizada para inocular meio de cultura LB contendo o antibiótico de seleção apropriado. Quando a bactéria foi transformada com replicons do HCV o crescimento foi feito sob aeração e à temperatura de 30 °C por 20 h. Para todos os outros plasmídeos o crescimento bacteriano foi feito sob aeração e 37 °C por 16 h. Para reações de purificação de DNA plasmidial de baixa escala (miniprep) (sessão 4.4.5) as bactérias foram crescidas em um volume de 10 mL de meio LB. Para purificações de larga escala (maxiprep) (sessão 4.4.6), as colônias foram crescidas primeiramente 10 mL de meio LB e posteriormente 4 mL desta cultura (pré-inoculo) eram transferidos para 400 mL de meio LB e incubada por mais 16 h.

4.4.4. Estoque de bactérias

Quinhentos microlitros das bactérias contendo o plasmídeo de interesse, crescida em meio bacteriano LB líquido, eram misturadas com 500 μL da solução de glicerol 60% (v/v) autoclavado. Após atingida a concentração final de 30% de glicerol as bactérias eram armazenadas em freezer -80 °C até serem necessárias novamente.

4.4.5. Purificação de DNA plasmidial em baixa escala (miniprep)

Para purificação de DNA plasmidial de culturas bacterianas em pequena escala foi utilizado o *Fermentas GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific). Resumidamente 10 mL da cultura bacteriana de interesse foi centrifugada e o sobrenadante removido. O precipitado bacteriano foi misturado com 250 µL da solução de ressuspensão e lisado com 250 µL do tampão de lise. A mistura foi neutralizada com a adição de 350 µL da solução de neutralização e centrifugada à 15 000 xg por cinco minutos para separação dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para a coluna de purificação e centrifugado à 15 000 xg por um minuto. O eluído foi descartado e 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna seguida de nova centrifugação. Novamente o eluído foi descartado e um novo ciclo de lavagem foi realizado. Após as lavagens, 40 µL de ddH₂O (ou tampão de eluição) aquecida à 50 °C foi adicionado ao centro da coluna e incubou-se por dois minutos à temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi feita e o eluído contendo o DNA de interesse foi armazenado em freezer -20 °C.

4.4.6. Purificação de DNA plasmidial em larga escala (maxiprep)

A purificação em larga escala das culturas bacterianas foi feita utilizando-se o *Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN) seguindo instruções do fabricante. Brevemente, 400 mL de cultura bacteriana foi precipitado por centrifugação à 17000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as bactérias ressuspendidas com 10 mL de tampão P1, lisadas com 10 mL do tampão P2 e a mistura neutralizada com 10 mL do tampão P3. Os restos celulares foram separados da solução por meio da centrifugação à 20 000 xg por 45 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna de purificação previamente equilibrada com 10 mL do tampão QBT. Após a passagem do sobrenadante (por gravidade) a coluna foi lavada duas vezes com 30 mL do tampão QC e o DNA eluído com 15 mL do tampão QF. Após a eluição o DNA foi precipitado com a adição de 10,5 mL de isopropanol e a centrifugação 3200 xg por 1 h à 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado de DNA lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) seguido de centrifugação à 17 000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim o etanol foi removido e o precipitado de DNA foi brevemente deixado exposto à temperatura ambiente para a eliminação total do etanol e ressuspendido em 200 µL de ddH₂O.

4.4.7. Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado utilizando um espectrofotômetro de pequena escala (NanoDrop - Thermo Scientific) a partir da leitura dos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Basicamente, 1 µL da amostra era pipetado no leitor e os valores de absorbância eram lidos pelo equipamento. Um OD_{260nm} no valor de 1 é equivalente a aproximadamente 50 µg/mL de DNA de fita dupla. A pureza do DNA testado era avaliada por meio da razão A_{260}/A_{280} , que deve ser próxima à 1,8 para ser considerado puro.

4.5. Manipulação de RNA

4.5.1. Água e PBS livre de RNase

Em todos os experimentos com RNA foi utilizado água e PBS livres de RNase. Para isto, foi adicionado 0,1% (v/v) de pirocarbonato de dietila (DEPC) às soluções que foram deixadas sob agitação por mais de quatro horas para eliminação de todos os traços de RNase. Para a inativação do DEPC as soluções foram autoclavadas por 20 minutos.

4.5.2. DsiRNA

Os DsiRNAs utilizados neste projeto foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT). Ao serem recebidos no laboratório foram ressuspensos com tampão para RNA de fita dupla livre de RNase (100 mM KAc / 30 mM HEPES pH 7.5) na concentração de 100 µM. Para evitar ciclos de congelamento, que podem ser nocivos à integridade da molécula, foram feitas diluições intermediárias de 10 µM. O controle de transfecção fluorescente (DsiRNA TYE 563™) e o controle negativo NC1 foram adquiridos junto à IDT. A sequência de todos os DsiRNAs utilizados no estudo podem ser encontrados no Capítulo V

4.5.3. Preparação da fita de DNA

Os plasmídeos contendo replicons do isolado JFH-1 (sub-genômico e genômico) foram linearizados com a enzima de restrição XbaI (NEB). A enzima foi inativada à 65

°C por 20 minutos e a amostra esfriada à temperatura ambiente por 10 minutos e no gelo por mais 10 minutos. A remoção dos nucleotídeos *overhang* resultantes da reação de digestão foram removidos com a enzima *Mung bean nuclease* (NEB) em conjunto com seu tampão apropriado e aquecendo a amostra à 30 °C por 45 minutos. A *Mung Bean Nuclease* foi inativada com 0,1% de SDS (v/v) e o DNA foi purificado pela técnica de fenol/clorofórmio e precipitado com etanol. O DNA foi ressuspensionado em 10 µL de água livre de RNase.

4.5.4. Transcrição *in vitro* do RNA

As transcrições em RNA da sequência contida nos plasmídeos foi feita com o T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Cada reação consistia em: 10 µL de *RiboMAX™ Express T7 2x buffer*, 1 µg da fita molde de DNA, 2 µL de *T7 express enzyme mix* e ddH₂O até o volume final de 20 µL. As reações foram homogeneizadas brevemente e incubadas à 30 °C por 90 minutos. A fita molde de DNA foi removida com a adição de 1 µL de RQ1 DNase para cada 1 µg de DNA utilizado na reação e nova incubação à 37 °C por 15 minutos. As enzimas, primers e nucleotídeos não incorporados foram removidos da mistura por meio da purificação com fenol/clorofórmio e precipitação do RNA com etanol. O precipitado final de RNA foi ressuspensionado em aproximadamente 20 µL de água livre de RNase, dividido em alíquotas e armazenado em freezer -80 °C.

4.5.5. Eletroforese em gel de Agarose para RNA

O RNA transcrito foi analisado em um gel desnaturante de RNA contendo ácido 3-morfolinopropanossulfônico e formaldeído. Em 30 mL de tampão MOPS (0.04 M MOPS, 0.01 M acetato de sódio, 0.001 M EDTA em água tratada com DEPC) foi dissolvido 1% (p/v) de agarose. A solução foi aquecida até que a agarose estivesse completamente dissolvida e após breve resfriamento 6,5% (v/v) de formaldeído foi adicionado a mistura. Um micrograma da amostra de RNA foi misturado a 10 µL do tampão de amostra de RNA (Formamida 56 % (v/v), Formaldeído 10 % (v/v), Glicerol 6 %, Azul de bromofenol 0.025 % (p/v) e 10 µg/mL de brometo de etídeo) e aquecidas à 65 °C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas no gel e a eletroforese foi feita em

tampão MOPS 1x utilizando uma voltagem de 70 v (8v/cm). Para avaliação do tamanho do fragmento de RNA, em cada corrida era adicionado ao gel 1 µL de *Millenium RNA ladder* (Ambion). O gel foi visualizado em transiluminador de UV e a imagem era digitalizada quando necessário.

4.6. Técnicas de cultura de células

4.6.1. Passagem de rotina

A linhagem de hepatoma humano Huh7.5 (Apath LLC) foi utilizada para produção de HCVcc e linhagens estáveis contendo replicons subgenômico. A linhagem 293FT (Life Technologies) derivada de células renais embrionárias humanas foi utilizada para o empacotamento das partículas lentivirais. Ambas as linhagem foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-aldrich), 1% de aminoácidos não essenciais e 20 mM de HEPES (Life Technologies) em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C. Para a passagem celular, o meio de cultura era removido, a monocamada lavada duas vezes com PBS seguida de incubação com tripsina 0,5 mg/mL e 2 mM EDTA (Sigma Aldrich) por aproximadamente 5 minutos em temperatura ambiente. A tripsina era inativada com a adição do mesmo volume do meio completo (10% SFB) e as células eram homogeneizada com pipeta sorológica para separação dos grumos. Por fim, 1/5 da suspensão celular era transferida para uma nova garrafa e o restante era descartado ou utilizado em outros experimentos. A passagem celular era feita a cada 2 dias ou até que as células estivessem próximas à confluência. Para linhagens celulares estáveis, o meio era suplementado com 500 µg/mL de G418 (Sigma Aldrich) para manutenção da seleção.

4.6.2. Congelamento de células Eucariótica

As células foram ressuspensas como descrito no tópico anterior e centrifugadas à 1000 xg por 5 minutos. O precipitado celular foi lavado duas vezes com 10 mL de PBS gelado e ressuspensado em uma solução contendo 90% de SFB (v/v) e 10% de DMSO (v/v). Os frascos contendo as células foram transferidos para um recipiente de

resfriamento gradual (-1 °C/min) e armazenados em freezer -80 °C. Para o descongelamento, as células eram transferidas imediatamente do freezer para banho-maria à 37 °C até o completo descongelamento. Em seguida as células eram misturadas à 9 mL de PBS gelado e centrifugadas à 1000 xg por 5 minutos. O precipitado celular era ressuspenso em 10 mL de meio de cultura completo aquecido e transferido para a garrafa de cultura. As garrafas de cultura eram armazenadas em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C até que fosse necessária nova passagem.

4.6.3. Eletroporação de RNA em células de mamíferos

Células da linhagem celular Huh7.5 eram cultivadas até estarem sub-confluentes (aproximadamente 70% de confluência) e ressuspenso como descritas no tópico 4.6.1. As células eram precipitadas por centrifugação à 1000 xg por 5 minutos e lavadas uma vez com 10 mL PBS tratado com DEPC gelado e outra com 10 mL tampão Cytomix (VAN DEN HOFF; MOORMAN; LAMERS, 1992) gelado. Após esta última lavagem as células eram contadas em um hemocitômetro e ressuspenso em Cytomix na concentração de 1×10^7 células/mL para ensaios com replicon subgenômico e 2×10^7 para eletroporação com o replicon completo. Quatrocentos microlitros dessa suspensão celular eram transferidos para uma cubeta de eletroporação (Eppendorf) de 4 mL gelada e misturada à 10 µg de RNA. A eletroporação foi feita em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser II (Bio-Rad) utilizando as seguintes condições: modo *square-wave*, voltagem de 270 V e tempo do pulso 25 ms. Após a aplicação do pulso elétrico, as células foram imediatamente transferidas da cubeta de eletroporação para 10 mL de meio DMEM completo aquecido à 37 °C e incubadas por 10 minutos para a recuperação da membrana celular. As células eram então semeadas de acordo com a necessidade do experimento posterior e incubadas em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C. Para experimentos com o replicon completo (HCVcc) as garrafas eram levadas até 4 h após eletroporação para a sala de segurança (NB2+) e todo material utilizado na eletroporação era tratado com hipoclorito de sódio 2% por 24h antes de ser descartado.

4.6.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos causados pelo tratamento com moléculas de RNAi na cultura foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTT com o reagente Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich). Após o período de incubação desejado o sobrenadante celular foi removido e adicionado 100ul a 1mg/mL do reagente de MTT dissolvido em meio de cultura DMEM livre de SFB e antibióticos. Após incubação por 30 minutos a 37 °C o sobrenadante foi removido e adicionado 100ul de DMSO. A placa de cultura foi submetida à agitação de 60 rpm por 5 minutos e realizada a leitura colorimétrica em comprimento de onda a 562nm. Os valores obtidos foram normalizados com o controle e expressos em valor de porcentagem de viabilidade.

4.6.5. Transfecção de células

Para a transfecção dos vetores lentivirais, 1×10^6 de células 293T foram semeadas em um placa de cultura com 10 cm de diâmetro com meio DMEM 10% SFB e sem antibióticos. No dia seguinte, o meio das células foi removido e a monocamada celular foi lavada duas vezes com 10 mL de PBS aquecido e 5 mL de meio DMEM 10% sem antibióticos foi adicionado à placa. Em um tubo de 1,5 mL, 500 μ L de meio Opti-MEM® (Life Technologies) foi misturado com PEI (Polyethylenimine 1 mg/mL) na proporção 1:5 (1 μ g DNA: 5 μ L PEI) e a quantidade apropriada de DNA. Em seguida o tubo foi agitado vigorosamente e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a mistura foi adicionada gota-a-gota à placa contendo a monocamada celular e incubada à 37 °C em estufa de CO₂. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura completo.

As moléculas de DsiRNAs/siRNAs foram transfectadas utilizando a formulação catiônica lipídica comercial Lipofectamina RNAiMAX (Life Technologies). Resumidamente, no dia da transfecção, uma solução com o volume final de 50 μ L foi preparada. Primeiramente, a quantidade necessária de DsiRNA foi diluída em 25 μ L meio de cultura livre de soro (Opti-MEM® - Life Technologies). Em outro tubo, 1 μ L de Lipofectamina RNAiMAX foi diluída em 24 μ L de Opti-MEM e incubada por cinco minutos. Por fim, o conteúdo de ambos os tubos foram misturados e foi feita uma incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. A mistura DsiRNA-Lipofectamina foi adicionada à uma placa de cultura de 24 orifícios com 500 μ L de DMEM completo

contendo as células a serem transfectadas. A eficiência de transfecção foi monitorada com a utilização do TYETM 563 DS (IDT), um duplex de RNA contendo uma molécula fluorescente.

4.6.6. Ensaio de luciferase

Células de linhagem estável com o replicon subgenômico do HCV contendo o gene repórter da *firefly luciferase* tratadas com DsiRNAs ou infectadas com vetores lentivirais foram lisadas com *passive lysis buffer* (Promega) 48/72 h após o tratamento inicial. Em ensaios com placa de 24 orifícios, após o tempo adequado de tratamento, o meio de cultura foi removido e a monocamada celular de cada orifício foi lavado duas vezes com PBS. Cem microlitros de 1x *passive lysis buffer* foi adicionado a cada orifício da placa e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. O lisado celular foi homogeneizado e 30 µL de cada amostra, em triplicata, foi transferido para uma placa branca de 96 orifícios para luciferase (Greiner Bio-One). O substrato de luciferase liofilizado (Promega) foi reconstituído com 10 mL do tampão de luciferase e injetado no leitor de placas automático BMG plate reader (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany). A placa contendo os lisados celulares foi introduzida no equipamento e o mesmo injetou automaticamente 50 µL de substrato de luciferase em cada orifício da placa. As leituras dos níveis de luciferase eram feitos 1 segundo antes da injeção do substrato até 10 segundo após a injeção, em intervalos de 0,5 segundos. Os valores relativos de luciferase foram automaticamente transformados em números e armazenados.

Para ensaios utilizando o replicon completo, contendo o gene repórter *renilla luciferase*, o procedimento foi semelhante ao acima descrito. A principal diferença é o substrato utilizado para a leitura dos níveis de luciferase, que era específico para *renilla luciferase*. Todos os experimentos com HCVcc foram realizados em sala de segurança biológica NB2+ e as amostras só foram retiradas do ambiente de segurança após inativação do material biológico.

4.6.7. Linhagens estáveis de células

Para gerar linhagens celulares estáveis, as células foram eletroporadas conforme descrito no tópico 4.6.3 com o replicon apropriado contendo o gene de resistência à neomicina. Dois dias após a eletroporação, o meio das células foi substituído por meio de seleção contendo DMEM, 2% SFB, penicilina/estreptomicina e 1 mg/mL de G418 (Sigma Aldrich). O meio das placas foi substituído a cada 48 h até que fosse possível observar a formação de colônias, aproximadamente 14 dias após o início do tratamento. As células foram ressuspendidas com tripsina e transferidas para uma garrafa de 175 cm³ para formar uma linhagem estável de células policlonais, neste ponto a concentração de SFB no meio de cultura foi aumentado para 10% e as células mantidas até que não fosse mais possível observar morte celular. Neste ponto as células foram novamente ressuspendidas e expandidas para novas garrafas e congeladas para uso posterior. A confirmação da identidade da linhagem estável foi feita por PCR para diferentes regiões do genoma viral e western blot para análise da expressão de proteínas.

4.7. Estudo de proteínas

4.7.1. Extração de proteínas

Para o ensaio de western blot as células a serem analisadas foram lisadas da seguinte forma: o meio de cultura foi removido e a monocamada celular lavada duas vezes com PBS à temperatura ambiente. Um volume apropriado de *Glasgow Lysis Buffer* (GLB) (10 mM PIPES (pH 7.2), 120 mM KCl, 30 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 Triton x-100, 20 % glicerol, leupeptin 1 µg/mL, pepstatin A 1 µg/mL, aprotinin 2µg/mL, 0.2 mM AEBSF (Pefabloc), 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM Na₄P₂O₇) (Harris e Coates, 1993) foi adicionado e as células incubadas no gelo por 15 minutos. Após a incubação as células foram raspadas da placa com um *cell scraper* e o lisado celular transferido para um tubo. Para a precipitação dos restos celulares, a amostra foi centrifugada à 17 000 xg por 10 minutos e o sobrenadante armazenado à -20 °C.

4.7.2. Ensaio de BCA

A concentração de proteína dos lisados celulares com GLB foi determinada com Pierce Micro BCA™ Protein Assay Kit (Pierce) seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, uma curva padrão foi feita com diferentes concentrações de albumina de soro bovina (BSA) diluídas em GLB 1x, as concentrações utilizadas foram 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 and 0.03125 mg/mL. A reação foi feita em placas de 96 orifícios transparentes e fundo chato e consistia na adição em cada orifício de 10 µL dos padrões ou amostras teste e 200 µL da solução ativa de BCA (50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B). A placa foi incubada à 37 °C por 45 minutos e o valor de absorbância no comprimento de onda de 570 nm foi lido em um leitor de placas automático (BMG plate reader). Um dos poços da placa contendo apenas tampão GLB e solução ativa de BCA foi utilizado como “branco” da reação e os valores de absorbância da amostra foram subtraídos pelos valores obtidos nesta amostra. Os valores de proteínas foram obtidos por interpolação a partir da curva padrão construída.

4.7.3. SDS-PAGE

Amostras de proteína desnaturada foram separadas em um gel SDS-PAGE utilizando um sistema Mini-Protean III minigel system (Bio-Rad). Placas de vidro que servem de molde para o gel foram limpas de com etanol 70% (v/v) para eliminação de resíduos de detergente ou partículas sólidas. Para o gel de separação (*resolving gel*) foi preparada uma solução de 12 % de bis-acrilamida contendo 0.35 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.1 % (p/v) persulfato de amônia (APS), 0.01 % (v/v) e N,N,N',N'-Tetramethylenediamine (TEMED). A solução foi adicionada às placas de vidro até ocuparem 3/4 do volume total e uma fina camada de isopropanol foi adicionada no topo da mistura para se obter uma superfície plana. Após a polimerização do gel de separação, o isopropanol foi removido e foi preparado o gel de empilhamento a partir da solução contendo 5 % (v/v) acrilamida, 0.175 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.1 % (p/v) APS, 0.16 % (v/v) TEMED. O gel de empilhamento foi adicionado em cima do gel de separação e o pente separador de amostras foi colocado. Em seguida, o molde de vidro contendo o gel foi lavado brevemente com tampão de corrida (25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS) e transferido para o tanque de eletroforese contendo tampão de corrida. As amostras foram misturadas na proporção 1:4 com 4x tampão Laemmli (100

mM Tris-HCl (pH 6.), 4 % (p/v) SDS, 15 % (v/v) glicerol, 10 mM DTT, 0.01 % (p/v) azul de bromofenol), desnaturadas por aquecimento à 95° por cinco minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi feita à 200 V por aproximadamente 1 h ou até que os marcadores estivessem na altura desejada.

4.7.4. Western blot

Ao término do SDS-PAGE, o molde de vidro foi desmontado, o gel de empilhamento cortado e o gel de separação foi transferido para um recipiente contendo tampão de transferência (25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM glicina, 20 % (v/v) metanol). Em outro recipiente uma membrana de PVDF (Millipore) de tamanho exato ao do gel foi ativada mergulhando-a em solução de metanol absoluto por 1 minuto e 3 minutos em tampão de transferência. Foi montado um “sanduiche” contendo papel de blot embebido em tampão de transferência – membrana de PVDF – gel de acrilamida – papel de blot com tampão. Para transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF o “sanduiche” foi transferido para dentro do equipamento de transferência (*Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*) onde foi aplicada uma voltagem de 15 V por 1 h. Após a transferência a membrana foi bloqueada com 5 mL da solução de bloqueio (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 % Tween-20 e 10 % (p/v) leite em pó desnatado) sob agitação à temperatura ambiente por uma hora. A solução de bloqueio foi substituída por uma solução contendo o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio 5% de leite desnatado e a membrana incubada por 16 h sob agitação à 4 °C. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T por dez minutos para eliminação dos anticorpos não ligados e incubada com o anticorpo secundário apropriado conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) também diluído em TBS-T 5% leite desnatado por duas horas sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada novamente três vezes com TBS-T por dez minutos. Ao final das lavagens, foi adicionado à membrana 1 mL de ECL (25 mM Luminol (3-aminophthalhydazide), 0.3 mM ácido p-courmárico, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.01 % peróxido de hidrogênio e 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) e a quimiluminescência foi detectada pelo equipamento ChemiDoc XRS System (Bio-rad).

4.7.5. *Stripping* de membrana de PVDF

A membrana de PVDF utilizada no ensaio de western blot pode ser reaproveitada ao se remover aos anticorpos anteriormente ligados à proteína. Para isto a membrana foi incubada com tampão de *stripping* (2 % SDS (p/v), 5 % 2-beta mercaptoethanol (v/v) em TBS Tween-20) por 40 minutos à 50 °C, lavada duas vezes com TBS-T por cinco minutos e bloqueada novamente como descrito acima.

4.7.6. Imunofluorescência

Para a reação de imunofluorescência, o meio das células de interesse era primeiramente removido e a monocamada celular lavada duas vezes com PBS. Em seguida as células eram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos (neste ponto as células contendo partículas infecciosas já podiam ser retiradas da sala de segurança). Após a fixação as células foram novamente lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich) por sete minutos. A seguir o anticorpo primário foi diluído na concentração apropriada em solução de PBS contendo 10% SFB, adicionado às células e incubado por uma hora à temperatura ambiente. Para a remoção de anticorpos não ligados, as células foram lavadas três vezes com PBS antes da adição do anticorpo secundário apropriado conjugado com a molécula fluorescente. As células foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente sob abrigo da luz. Após o tempo de incubação as células foram lavadas cinco vezes com PBS e analisadas em microscópio de fluorescência com o comprimento de onda apropriada ao fluorófilo do anticorpo secundário.

4.8. Estudo com vírus completo

4.8.1. Ensaio com vírus completo

Partículas virais infecciosas de HCV derivadas de cultura de células (HCVcc) foram produzidas por meio da eletroporação de células Huh7 ou Huh7.5 com o RNA transcrito a partir do plasmídeo contendo a sequência codificante do HCV genótipo 2a isolado JFH-1 ou o vírus quimérico 2a/2a J6/JFH-1 contendo o gene repórter da *renilla*

luciferase. Após a eletroporação as células foram transferidas para uma garrafa de 175 cm³ e levadas para incubação em estufa de 5% CO₂ e 37 °C localizada dentro da sala de segurança biológica NB2+. A partir deste ponto, todo o trabalho foi realizado no interior da sala de segurança tomando todas as precauções necessárias. Todos os descartes líquidos foram tratados com Virkkon (DuPont) por 24 horas antes de serem descartados na pia. Descartes sólidos eram tratados com Virkkon por 24 horas e autoclavados antes de serem retirados da sala de segurança. Todas as amostras oriundas dos ensaios com HCVcc eram inativadas com paraformaldeído 4%, GLB/PLB ou Trizol antes de serem removidas da sala de segurança.

O sobrenadante contendo HCVcc era coletado das garrafas eletroporadas a cada 48 h e armazenado à 4 °C até uso posterior. Quando as células alcançavam 80% de confluência foi feita a passagem das células na razão de 1:3. A coleta de sobrenadante foi feita por até um mês após a eletroporação.

4.8.2. Titulação viral

Para determinar aproximadamente a quantidade de HCVcc contido no sobrenadante coletado no ensaio anterior foi feita a titulação viral. Para isto, 8x10³ células Huh7.5 foram semeadas em uma placa de 96 orifícios e no dia seguinte foram infectadas com uma diluição seriada do sobrenadante contendo HCVcc. Para a diluição seriada, 100 µL de sobrenadante viral foi adicionado no primeiro poço da placa, e 10 µL deste sobrenadante foi removido e passado para o orifício posterior, que já continha 90 µL de meio. Este procedimento foi repetido por mais quatro vezes até que se obtivesse cinco diluições diferentes. A placa contendo as células infectadas foi incubada por 72 h em estufa à 5% CO₂ e 37 °C e posteriormente o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 100 µL de paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após a fixação procedeu-se o protocolo de imunofluorescência descrito no tópico 4.7.6. Para se determinar o título viral, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência utilizando a lente de aumento 20 x e cubo de excitação de 594 nm. Desta forma foi possível contar os focos de infecção viral e determinar o título aproximado da amostra testada. O título é expresso em unidades formadoras de foco (ffu) por mililitro. Um foco é definido por um célula ou um grupo de células separadas de outro foco por pelo menos uma célula não infectada.

4.8.3. Teste de inibição da replicação de HCVcc com DsiRNAs

Para avaliar os efeitos dos DsiRNAs em HCVcc, 2×10^4 células Huh7.5 foram semeadas por orifício em uma placa de 24 orifícios. No dia seguinte as células foram transfectadas utilizando o protocolo descrito na sessão 4.6.5 e incubadas por 24 h. O sobrenadante foi removido e 500 μ L de sobrenadante viral contendo HCVcc (J6/JFH-1 RLuc) foi adicionado aos orifícios das células, com uma multiplicidade de infecção de aproximadamente 0,1. Dois dias após a infecção o sobrenadante das células foi removido e as células lisadas com tampão PLB e os valores de luciferase lidos conforme descrito no tópico 4.6.6.

Uma outra abordagem foi utilizada neste experimento, no qual as células foram primeiramente infectadas com o sobrenadante viral e 24 horas pós-infecção as células foram transfectadas com os DsiRNAs relevantes. As concentrações e M.O.I foram os mesmos para ambos os ensaios.

4.9. Produção de partículas lentivirais

4.9.1. Transfecção do vetor viral nas células de empacotamento

Para a transfecção para empacotamento dos vetores lentivirais aproximadamente 1×10^6 células 293FT foram semeadas em uma placa de 10 cm de diâmetro e incubadas em estufa com 5% de CO₂ à 37 °C. No dia seguinte, utilizando o protocolo descrito no tópico 4.6.5 as células foram transfectadas com 7.5 μ g pCS-RfA-EG (contendo o shRNA de interesse), 4.4 μ g pCAG-HIVg, 4.4 μ g pCMV-VSV-G-RSV-Rev e 80 μ L de PEI. Um dia após a transfecção o meio de cultura foi substituído por 10 mL de meio completo. O sobrenadante contendo os vetores lentivirais foi coletado a cada 24 horas por até 96 horas. No momento da coleta do sobrenadante ele era centrifugado à 1000 xg por cinco minutos à 4 °C para remoção de restos celulares e armazenado à – 80 °C até utilização posterior.

4.9.2. Titulação

Para determinação da infectividade e o título viral contido nos sobrenadantes coletados, 1×10^4 de células Huh7.5 foram semeadas em uma placa de 96 orifícios e

incubadas em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C. No dia seguinte a placa foi infectada e três dias após infecção a monocamada celular foi observada ao microscópio de fluorescência para contagem dos focos de fluorescência. Este vetor viral possui o gene repórter GFP que expressa uma proteína fluorescente nas células infectadas pelo mesmo. Portanto, não foi necessário a reação de imunofluorescência para a titulação deste vírus.

4.9.3. Teste de inibição em replicon sub-genômico

Para verificar se vetores virais contendo genes codificadores de shRNAs contra o genoma do HCV eram efetivamente capazes de inibir a replicação do HCV foram semeadas 3×10^4 células da linhagem estável SGR-FEO-JFH-1 em uma placa de 24 orifícios e incubadas em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C. No dia posterior, o meio de cultura das células foi removido e substituído por 500µL de meio de cultura infeccioso contendo os vetores lentivirais. As células foram incubadas em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C por mais 72 h e foram lisadas com tampão PLB utilizando protocolo já descrito anteriormente. Os níveis de luciferase intracelular foi lido como descrito no tópico 4.6.6 e os níveis de inibição foram obtidos a partir da porcentagem de expressão das amostras teste em relação a amostra controle (shRNA scrambled).

Referências

MACDONALD, A. et al. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 17775-84, May 16 2003.

TSCHERNE, D. M. et al. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. **J Virol**, v. 80, n. 4, p. 1734-41, Feb 2006.

VAN DEN HOFF, M. J.; MOORMAN, A. F.; LAMERS, W. H. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 11, p. 2902, Jun 11 1992.

WYLES, D. L. et al. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2660-2, Jun 2009.

Capítulo V

5. Artigo I

Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Dicer Substrate siRNA

Bruno Carneiro^{1,2}; Ana Cláudia Silva Braga¹; Mariana Nogueira Batista¹; Mark Harris^{2*},
Paula Rahal^{1*};

¹ - Genomics Study Laboratory, Sao Paulo State University, IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brazil

² - School of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, UK.

* - These authors contributed equally to this work

Corresponding author: prahal@ibilce.unesp.br

Abstract Hepatitis C virus (HCV) frequently establishes persistent infections in the liver, leading to the development of chronic hepatitis, and, potentially, to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma at later stages. No vaccine is available for HCV and the current standard of care, which consists of pegylated interferon- α and ribavirin, has limited efficacy against certain HCV genotypes, and also produces significant adverse effects. The objective of this study was to test the ability of five Dicer substrate siRNAs (DsiRNA) to inhibit HCV replication. DsiRNA molecules were designed to target 5 distinct regions of the HCV genome – 5' UTR and the coding regions for NS3, NS4B, NS5A or NS5B. These molecules were transfected into Huh7.5 cells stably harboring an HCV subgenomic replicon expressing a firefly luciferase/neoR reporter (pSGR-FEO-JFH1) and also tested on HCVcc-infected cells. All of the DsiRNAs inhibited HCV replication using either the subgenomic system or HCVcc-infected cells. When DsiRNAs were transfected prior to infection with HCVcc, inhibition levels reached 99.5%. Long-term culture of replicon cells with, DsiRNAs (21 days) did not lead to the selection of resistant clones. We propose that DsiRNAs are a more potent molecule than canonical 21 nt siRNAs for the inhibition of HCV replication and do not exhibit selection of resistant clones *in vitro*. New studies are necessary on *in vivo* models, and better delivery methods are needed. Thus, DsiRNA molecules may be an option for treatment of chronically infected HCV patients in the future.

Keywords: hepatitis c virus, RNAi, dicer substrate siRNA, knockdown.

5.1. Introduction

Approximately 180 million people are chronically infected by hepatitis C virus (HCV), and studies in the USA recently found that deaths caused by HCV infection exceeded mortalities resulting from HIV infection (LY et al., 2012). HCV is a virus with positive polarity RNA, a member of the *Flaviviridae* family, and it encodes a polyprotein that is post-translationally processed into 10 functional proteins (BARTENSCHLAGER; FRESE; PIETSCHMANN, 2004). In 85% of patients who are acutely infected, the virus evolves to chronic infection (HOOFNAGLE, 2002). From these, 20% of cases progress to cirrhosis, and 1-4% progress to hepatocellular carcinoma (RUSTGI, 2007). Conventional treatment for chronically infected HCV patients is the combined administration of ribavirin and interferon- α (NEYTS, 2006), and more recently, the availability of direct acting antivirals such as the NS3 protease inhibitors boceprevir or telaprevir (HEZODE, 2012) has improved the treatment prospects for HCV infection. However, current treatment still has limited effectiveness, and viral resistance to traditional drugs has been reported (THOMAS et al., 2012). Thus, the search for new drugs and therapies for the management of chronically infected HCV patients is still necessary.

RNA interference is a process of post-transcriptional gene silencing that has been identified in all eukaryotes (FIRE et al., 1998; HANNON, 2002). Since its first report, this mechanism has been found to be useful in molecular biology both for the study of gene functions and as a therapeutic agent (HARBORTH et al., 2001; CASTANOTTO; ROSSI, 2009). The functional molecule of RNAi is the RNA-induced silencing complex (RISC), which is responsible for cleavage of an mRNA in a sequence-specific fashion. The specificity of this reaction is given by a 21 nt sense strand incorporated into the RISC complex. This sense strand comes from the digestion of double stranded RNA (dsRNA) by DICER endonuclease (ELBASHIR et al., 2001). Synthetic 21 nt siRNAs can be introduced into cells and can selectively induce suppression of a specific gene of interest. A few reports have shown that HCV could be efficiently inhibited by RNA interference using different methodologies and subgenomic replicon (SGR) systems (KAPADIA; BRIDEAU-ANDERSEN; CHISARI, 2003; RANDALL; GRAKOU; RICE, 2003; WILSON et al., 2003; YOKOTA et al., 2003).

Dicer substrate siRNAs (DsiRNAs) are 27-nt-long double strand RNAs that are capable of inducing an inhibition of an mRNA specific sequence without the activation

of the IFN pathway (KIM et al., 2005). These DsiRNA are recognized by DICER enzymes and digested into smaller 21 nt dsRNA fragments, which are then recognized and incorporated by the RISC complex to finally degrade the targeted mRNA. Recent studies have shown that DsiRNAs are more potent than conventional synthetic siRNAs (PICHU et al., 2012; ZHOU et al., 2013).

A major drawback for therapy with RNAi for an RNA virus is the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) responsible for viral genome replication. RdRp has a high error rate due to a lack of proofreading; therefore, the mutation rates for these viruses are relatively high. HCV has an estimated error rate of 10^{-4} (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000), and this leads to the formation of virus variants within the patient. This large number of variants is referred to as a quasispecies (HOLLAND; DE LA TORRE; STEINHAEUER, 1992). The long-term treatment of cells infected with HCV, or of those harbouring an SGR, with RNAi molecules induced the selection of resistant viral quasispecies; thus there was a reduction in treatment efficiency (KONISHI et al., 2006).

In this present study, we developed five DsiRNA molecules directed to the HCV genome and showed that these could inhibit virus replication efficiently. Moreover, the higher potency of DsiRNAs compared to canonical 21 nt siRNAs was confirmed, and it was verified that, after three weeks, SGR-harboring cell populations treated with DsiRNA molecules did not exhibit resistant clones .

5.2. Materials and Methods

HCV replicon constructs

SGR-JFH FEO is a bicistronic subgenomic replicon (WYLES et al., 2009) based on the genotype 2a JFH-1 virus isolate and containing a firefly luciferase gene fused to a neomycin resistance gene (FEO). FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi is a monocistronic full-length virus system (TSCHERNE et al., 2006) based on the sequence of J6 (genotype 2a) and JFH-1 (genotype 2a), which expresses the *Renilla* luciferase gene. SGR-JFH FEO was used to produce a stable Huh7.5 cell line, FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi was used to produce HCVcc particles.

Mammalian cell culture

Huh7.5 cells (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002) were cultured in DMEM media (Sigma aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1x nonessential amino acids, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C, 5% CO₂, in a humidified incubator. Stable cell lines were maintained with 800 µg/mL G418 (Sigma aldrich).

RNA transfection of Huh7.5 cells

To transcribe RNA from complementary DNA templates, plasmids were linearized with XbaI (NEB, Ipswich, MA, USA), followed by a treatment with mung bean nuclease (NEB). RNA was transcribed using a T7 Ribomax Express kit (Promega, Fitchburg, WI, USA). RNA was transfected into cells, as previously described (AMAKO et al., 2009). Huh7.5 cells were briefly trypsinized, washed once in ice-cold PBS, and then once in an ice-cold Cytomix buffer (van den Hoff et al., 1992). The cells were then resuspended in ice-cold Cytomix at 1×10^7 cells/ mL. Ten micrograms of synthesized RNA was mixed with 400 µL cell suspension and electroporated at 270 V for 25 ms in a square wave mode of a Gene Pulser Xcell electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For stable cell line development, 1 µg of transcribed RNA was transfected with a DMRIE-C reagent (Life Technologies) following manufacturer instructions. Forty-eight hours after transfection, G418 (Sigma Aldrich) at a 800 µg/mL concentration was added to the culture media. After four weeks, the identification of colony formation was possible.

DsiRNA against HCV genome

Five double-stranded RNA Dicer substrates (DsiRNAs) that are 27 nt in length (KIM et al., 2005) were designed to target five distinct regions of HCV mRNA: 5'UTR, NS3, NS4B, NS5A and NS5B. The DsiRNA molecules (IDT, Coralville, IA, USA) were designed according to the algorithm described by Kim et al. (2005). DsiRNA molecule NC1 was purchased as a negative control (IDT); this molecule has no homology to any human gene or to the HCV genome.

DsiRNA Transfection method

SGR-JFH FEO stable cells were trypsinized and 3×10^4 cells/well seeded into a 24-well plate and incubated for 24 h before transfection. The RNAi-specific cationic lipid formulation Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) was used as a transfection reagent. Briefly, on the day of transfection, a 50- μ L transfection mix was prepared. In one tube, the desired amount of DsiRNA was mixed with serum-free media (Opti-MEM, Life Technologies) without antibiotics to a final volume of 25 μ L. In another tube, one microliter of Lipofectamine RNAiMAX was mixed with Opti-MEM to a final volume of 25 μ L and subsequently combined with the DsiRNA solution and incubated at room temperature for 10 min. The DsiRNA-Lipofectamine RNAiMAX solution was then added dropwise to each well and manually homogenized for one minute. Transfection efficiency was monitored through transfection with TYE™ 563 DS Transfection Control (IDT), a DsiRNA duplex labeled with a fluorescent dye.

DsiRNA transfection in HCVcc-infected Huh7.5 cells

HCVcc containing supernatant was titrated by a focus forming assay, and Huh7.5 cells were infected at a multiplicity of infection of 0.1. Twenty-four hours after infection, cells were washed twice with PBS, fresh complete media were added to the wells, and cells were transfected with DsiRNA as described above. After 48 h post infection cells were lysed and subjected to luciferase assay. In another experiment, cells were first treated with DsiRNAs before infection with the infectious supernatant using the same multiplicity of infection.

Long-term experiment

To evaluate the effects of long-term treatment with DsiRNA molecules, cells were transfected two times (5 days apart) with different DsiRNA and negative control into 24-well plate. When the cells approached confluence, they were trypsinized and transferred onto a plate with a larger diameter. The selective media containing 1 mg/mL G418 (Sigma Aldrich) were changed every two days. Cyclosporine A (Sigma Aldrich), at 1 μ g/mL was used as a positive inhibition control. After 21 days of treatment, cells were fixed with 10% formaldehyde and stained with crystal violet (Sigma Aldrich).

Sequencing of resistant colonies

Colonies of cells resistant to long-term treatment were resuspended, transferred to a 24 wells plate and maintained for seven days. After this period the cells RNA was extracted by Trizol (Life technologies) method following the manufacturer's instructions. Five hundred nanograms of each RNA was reverse transcribed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Complementary DNA was amplified using primers flanking the target region of each DsiRNA and Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). The PCR product was subsequently purified and subjected to sequencing reaction with BigDye Terminator (Life technologies) and products were sequenced in an ABI 3130XL Sequencer (Life technologies).

Luciferase assay

Cells were harvested through the addition of 100 μ L of Passive Lysis Buffer (Promega). Twenty-five microliters of cell lysate were transferred to a white 96 well plate. Next, 50 μ L of Luciferase substrate (Luciferase Assay System, Promega or Renilla Luciferase Assay system) was automatically added, and luminescence was read by a BMG plate reader (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany).

Antibodies

Sheep antisera against HCV NS5A have been described previously (MACDONALD et al., 2003). Monoclonal antibodies to glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH; Abcam, Cambridge, MA, USA) were obtained commercially and used at concentrations recommended by manufacturer; HRP- (Life technologies) or Alexa-Fluor 594 (Life technologies)-conjugated secondary antibodies were used for Western blotting or immunofluorescence, respectively.

Immunoblotting

Cells were lysed in a Glasgow lysis buffer (GLB; 10 mM Pipes- KOH (pH7.2), 120 mM KCl, 30 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% TritonX-100 (Sigma), 10% glycerol) supplemented

with protease and phosphatase inhibitors (2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 5 mM Na₄P₂O₇). Proteins were resolved by SDS/PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA).

5.3. Results

DsiRNA target sequences

To develop DsiRNA molecules that are able to efficiently inhibit HCV replication, the sequence of the HCV genotype 2a isolate JFH-1 was screened using the bioinformatics tool RNAi Design from IDT SciTools (IDT, USA). Based on the algorithm described by Kim et al. (2005), the software suggested twenty different targets in the HCV genome which in theory could effectively inhibit the replication of the virus. From these options, five sequences were chosen to be synthesized and tested in vitro (Figure 1). The inclusion criteria for the study were the scores given by the software, the homology with other HCV genotypes and the spatial separation of the sequences across the virus genome. The targeted coding regions, homology with other genotypes and the exact position of the DsiRNA molecules designed are summarized in table 1.

DsiRNA inhibition of HCV replication is specific and concentration dependent

Parameters for efficient transfection of Huh7.5 cells with DsiRNA were established using a fluorescently tagged control DsiRNA – a routine transfection efficiency of 85-90% was observed in Huh7.5 (data not shown). Additionally, an MTT assay revealed that DsiRNA molecules had an LD₅₀ of approximately 50nM and at 100 nM, the commonly used concentration for conventional 21 nt siRNA, cell viability decreased to 30%. However, at concentrations below 10 nM, DsiRNA molecules did not reduce Huh7.5 cell viability (> 90% viability observed – data not shown). Using the same transfection protocol with variable DsiRNA concentration on an SGR-JFH FEO stable cell line, we found that DsiRNAs targeting the NS5A coding region were able to reduce levels of HCV replication, as evaluated by a luciferase assay (Figure 2). As expected, the reduction of luciferase levels was dependent on the concentration of DsiRNA used for the transfection. Concentrations as low as 100 pM were capable of reducing luciferase levels to more than 40% of the mock control. The most potent knockdown was seen using 10 nM of DsiRNA,

although the difference between this value and that found with a 5-nM concentration was small (< 5%). Therefore the latter concentration was used in all subsequent experiments. A negative control DsiRNA (NC1, IDT), did not reduce luciferase levels (Figure 2b) which remained at similar levels to mock controls (transfection reagent only), confirming that the reduction of luciferase levels using virus-directed DsiRNAs was specific, and not an off-target effect or a cell response to transfection.

Efficiency changes according to HCV region

We then set out to determine whether different DsiRNAs inhibited HCV replication with similar efficiency. As shown in Fig 2, there were indeed differences in the ability of DsiRNAs targeting different regions of viral genomes to inhibit HCV replication. At 72 h post transfection all of the DsiRNA tested reduced HCV replication (Figure 3) by at least 77%, with the most efficient being targeted at the NS5B coding sequence (93% \pm 2.8 reduction compared to negative control), followed by NS4B (92,8% \pm 3.4), NS3 (91.6% \pm 1.9), NS5A (86.8% \pm 3.1) and 5' UTR (77.9% \pm 2.7). To confirm this result, the expression of the NS5A protein was evaluated by Western blot assay using a polyclonal NS5A antiserum – NS5A expression was reduced to undetectable levels by four of the five DsiRNAs and only just detected in cells transfected with the DsiRNA targeting the 5'UTR. (Figure 4).

Inhibition of virus infection

To assess whether the DsiRNAs molecules were also effective in the context of virus infection, cells were transfected with one of the five DsiRNAs before infection with FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi (HCVcc). After 48 h post-infection, we observed that transfected cells were almost completely resistant to viral replication (Figure 5a). Depending on the DsiRNA tested, virus replication measured by intracellular *Renilla* luciferase levels was reduced by more than 99.5% (NS5B) and 98.4% (NS4B). On the other hand, when cells were infected before transfection, inhibition levels were similar to those observed in the sub-genomic cell system (Figure 5b). The two most efficient molecules were those that targeted the coding sequence of NS5B (92,5%) and NS4B (90.6%).

Long-term inhibition

To be effective a DsiRNA molecule should be completely homologous with its target region. It is known that HCV has a high mutation rate and this characteristic may cause nucleotide substitutions at the target site of the DsiRNA molecules. Therefore, we performed a long-term experiment to verify that the prolonged use of DsiRNAs was able to select clones resistant to treatment with these molecules. After a single transfection event with DsiRNA NS5B, stable replicon cells were cured from the replicon 17 days after the transfection event. In this experiment, cells were maintained in absence of a selection antibiotic. Prolonged culturing of replicon cells without antibiotics may lead to a natural cure of virus replicon. To exclude this hypothesis, we transfected stable replicon cells with the four most effective DsiRNAs and treated them with G418 for 21 days (Figure 6). Plates transfected with the highly effective DsiRNAs NS5B and NS4B had fewer than five colonies after selection.

Identification of resistance

In order to verify if the surviving colonies of long-term experiment were a consequence of mutations at the DsiRNA target site, five colonies were randomly selected, from each selection plate, and transferred to a 24 well plate. These colonies were grown for another seven days in presence of the selection antibiotic G418 (1 mg / mL) and then RNA was extracted, amplified by RT-PCR and sequenced. It was possible to obtain sequences of at least two clones for each group of cells treated with DsiRNAs. After analysis of the sequences it was verified that there were no mutations in regions targeted by DsiRNAs (data not shown).

5.4. Discussion

In this report, we show the ability of dicer substrate siRNAs (DsiRNAs) to reduce HCV replication *in vitro* using both a sub-genomic and a full-length replication system. In both models, viral replication was reduced by at least 90% using 5 nM of DsiRNAs. To our knowledge, this is the first report to demonstrate the inhibition of HCV by these RNAi molecules, Other authors have found similar efficiency for virus knockdown using the canonical 21 nt siRNAs (CHEVALIER et al., 2007; TREJO-AVILA et al., 2007), but

to achieve the same inhibition levels, authors employed a concentration that was almost 20x higher than the one we used in our assays. This difference may be explained by the molecular properties of DsiRNAs.

The two critical players in the RNAi pathway are DICER, a endoribonuclease responsible for cleaving long (> 21 nt) double-stranded RNAs into smaller pieces with 21 nt of extension, and the RISC complex, which is responsible for unwinding one dsRNA strand and using it as a template to identify homologous mRNAs in order to cleave them (ELBASHIR et al., 2001). The higher potency of DsiRNA molecules may be the result of a previously identified link between DICER and the RISC complex (LIU, M. et al., 2006; LIU, X. et al., 2006). When transfected into cells, canonical 21-nt siRNAs are readily recognized by the RISC complex and are used as template to target knockdown (HARBORTH et al., 2001). On the other hand, 27 nt long DsiRNA molecules need to first be processed by DICER into smaller fragments, and they must then be loaded into the RISC complex so that the combination of the DsiRNAs and the RISC complex can function (KIM et al., 2006). Because traditional siRNAs are not processed by DICER, the integration of these siRNAs into the RISC complex may be less efficient than the DsiRNAs that are processed by the nuclease enzyme, and that difference may explain the higher potency of the 27 nt molecules.

In this study, we designed five DsiRNA molecules for different HCV genome regions. Three molecules that used the NS5B, NS4B and NS3 regions as targets were able to reduce viral replication by more than 80%. The other two (5' UTR and NS5A) molecules had only a moderate effect on virus knockdown (< 70%). Although some studies have found that virus replication may be reduced using siRNAs directed to 5'UTR (KORF et al., 2005; PRABHU et al., 2005) or NS5A (KAPADIA; BRIDEAU-ANDERSEN; CHISARI, 2003; SEN et al., 2003), our molecules were not very efficient. With specific reference to the 5'UTR targeted sequence, the low efficiency is probably due to the highly structured characteristic of this site (FRASER; DOUDNA, 2007), which may hinder the physical ligation of the DsiRNA molecule to its target sequence.

After the relative success of experiments with the sub-genomic system, we decided to test the efficacy of the DsiRNA molecules in a full-length replicon system. In this assay, two different approaches were tested. First, Huh7.5 cells were infected with HCVcc particles 24h hours before transfection with DsiRNAs. Using this approach, as expected, we obtained almost the same levels of inhibition observed in the assays with the sub-genomic system and described by other authors (PRABHU; GARRY; DASH,

2006; CHEVALIER et al., 2007). Second, cells were treated with DsiRNAs before infection with HCVcc, but in this case, inhibition levels increased fourfold in a comparison to the previous assay. In the sub-genomic and pre-infection assay, the quantity of viral RNA inside the cells at the moment of transfection with DsiRNA was relatively high, and therefore, not all virus RNA could be cleaved. On the other hand, when DsiRNAs are already present inside the cells at the moment of virus infection, the quantity of intracellular viral RNA is relatively low, and consequently, this viral RNA is quickly degraded by RNAi, thus preventing the formation of new viral RNAs inside the cells. This information suggests that, in the future, DsiRNAs may play a role in prophylactic therapy or as a post-infection treatment drug.

It is important to note that, for a positive-stranded RNA virus like HCV, which encodes a single polyprotein cleaved only after translation (DUBUISSON; PENIN; MORADPOUR, 2002), the importance of the selected viral encoding gene for RNAi design, and therefore protein, is irrelevant. Other studies on *Drosophila* cells have found that, after the initial cleavage of targeted mRNA mediated by the RISC complex, the mRNA is quickly degraded at its 5' fragment by exosomes and at its 3' fragment by an exoribonuclease named XRN1 (ORBAN; IZAURRALDE, 2005). Therefore, in the case of HCV, after initial cleavage by the RISC complex, the whole virus genome is degraded in the cytoplasm, and no replication or translation occurs. Because of this, during the design step of RNAi molecules, it is important to focus only on the physical and chemical properties of the target region, and not on the importance of the target region in the virus life cycle.

A well-known characteristic of HCV replication is the rapid generation of virus variants. Within a single patient, there are many variants of the initial infectious sequence. These variants are referred to as quasispecies (HOLLAND; DE LA TORRE; STEINHAUER, 1992). This large number of variants is mainly the result of the high error rate of the RNA-dependent RNA polymerase (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000). To be effective, an RNAi molecule needs to be 100% homologous to its target sequence. Consequently, a single base change to the target sequence of a siRNA or DsiRNA could greatly reduce the efficiency of those molecules (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001). Thus, the elevated error rate of HCV replication may be an issue during treatments with RNAi molecules, as reported by Konishi *et al.* (2006). In order to assess the emergence of escape mutants, we treated DsiRNA-transfected cells with G418 for three weeks. We found that, in the case of the highly effective DsiRNAs

(NS5B, NS4B and NS3), almost no colonies (< 5 colonies/plate) were visible after selection time. Our data suggests that, after two transfection events, sub-genomic replicons were cleared from most cells, and no resistant variants were selected as indicated by the sequences obtained from the colonies that survived the long-term experiment. Huh7 cells are known to be genetically plastic and it is possible that these clones were derived from cells that contained a mutation in the DICER pathway. Alternatively, it has been found that cleavage of the 27-mer Dicer substrates may result in a variety of different 21-mer molecules; however, only one of these short molecules is actually effective against its target sequence (KIM et al., 2005). Nevertheless, all other variants still continue to be produced. We hypothesize that these other, less effective, shorts variants may play a role in avoiding the selection of HCV-resistant variants during the long-term assay; however, no experiment was performed to confirm this hypothesis, and therefore, more studies are needed. As no mutations in the target sites of DsiRNAs were identified, we believe that the presence of the few colonies after the end of the long-term experiment with highly effective DsiRNA molecules can be explained by the fact that the transfection process not being able to deliver molecules DsiRNAs to all cells. Therefore, the levels of viral replicon (which has the neomycin resistance gene) remained stable, allowing cells to survive treatment with G418.

5.5. Conclusions

In this study, we managed to reduce replication of an HCV sub-genomic replicon by more than 90%, and replication of HCVcc virus by approximately 99% using Dicer substrate siRNAs. Resistance assays revealed that, after 21 days, resistant clones could not be detected. Therefore, DsiRNAs are a relatively new and more potent molecular tool that can better aid in the prevention of the selection of evading sequences compared to canonical 21-nt siRNAs. In the future, DsiRNAs may be used as a therapeutic approach for chronic HCV-infected patients.

Acknowledgements

This work was in part supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant no 2009/08534-9 and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil, grant no 5290-11-2.

Table 1

Name	Target	HCV genotype	Position ^a	Sequence ^b
DsiRNA 1	NS5B	2a	8916-8940	S: 5' – CAACCAUAUGGGUUCGCAUGGUCCT – 3' AS: 5' – AGGACCAUGCGAACCCAUAUGGUUGGA – 3'
DsiRNA 3	NS5A	2a	6993-7017	S: 5' – CCUGCACCACCCACAGCAACACCTA – 3' AS: 5' – UAGGUGUUGCUGUGGGUGGUGCAGGUG – 3'
DsiRNA 5	NS4B	2a	5760-5784	S: 5' – CCAGUACCACCAUCCUUCUCAACAT – 3' AS: 5' – AUGUUGAGAAGGAUGGUGGUACUGGUC – 3'
DsiRNA 7	NS3	2a	4040-4068	S: 5' – GCUCCAACUGGCAGUGGAAAGAGCA – 3' AS: 5' – UGCUCUUUCCACUGCCAGUUGGAGCAU – 3'
DsiRNA 19	5'UTR	1, 2, 3, 4, 5, 6	44-88	S: 5' – CUGUGAGGAACUACUGUCUUCACGC – 3' AS: 5' – GCGUGAAGACAGUAGUCCUCACAGGG – 3'

^a Relative to JFH-1 genome; ^b S: Sense strand, AS: Antisense strand. Last two nucleotides of sense strand are DNA bases

Figures



Figure 1. Schematic of the HCV genome. The arrows indicate the approximate target location of DsiRNAs molecules used in this study.

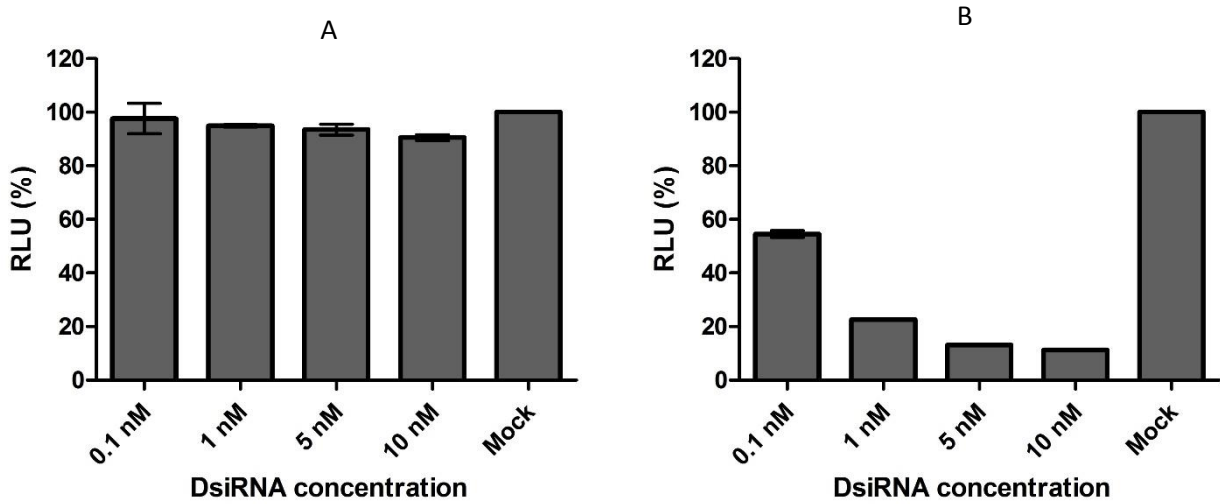


Figure 2. SGR-JFH FEO cells were transfected with different concentrations of the negative control DsiRNA (A) or HCV-specific NS5A DsiRNA (B). Results are shown as a percentage of the treated sample compared to the mock control (sample transfected with media only).

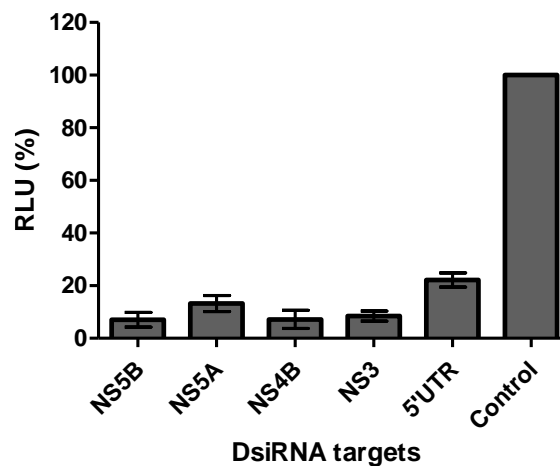


Figure 3. SGR-JFH1 FEO cells were transfected with 5nM of each DsiRNA and analyzed 72h post transfection by measuring luciferase levels in cell lysates. Values are presented

as percentage of luciferase activity relative to the negative control (Scrambled DsiRNA sequence). Labels on X axis indicate the region to which DsiRNAs were directed.

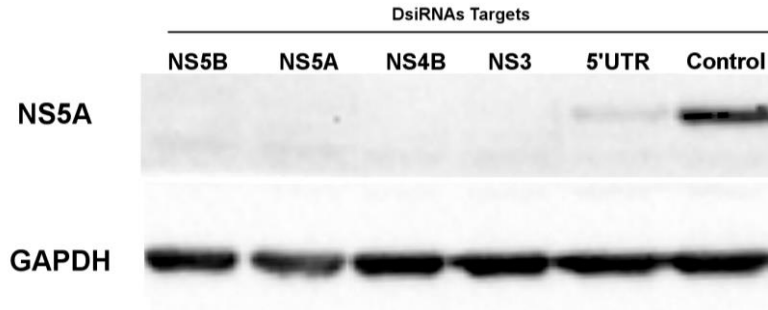


Figure 4. Protein expression levels in SGR-JFH1 FEO cells treated with DsiRNAs (5nM) and lysed after 72 h; Control: negative control (Scrambled DsiRNA sequence).

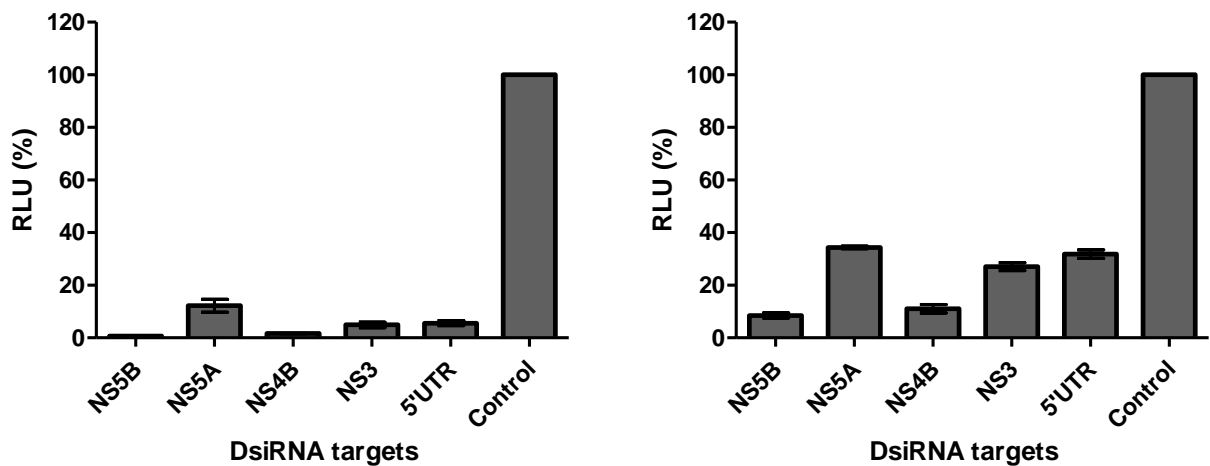


Figure 5. Huh7.5 cells were transfected with 5 nM of each DsiRNA before (A) or after (B) infection with HCVcc (MOI of 0.1). Forty-eight hours after infection, cells were lysed in PLB and luminescence levels were read on a BMG plate reader. Values indicated as percentage of luminescence of treated sample compared to negative control (C-)

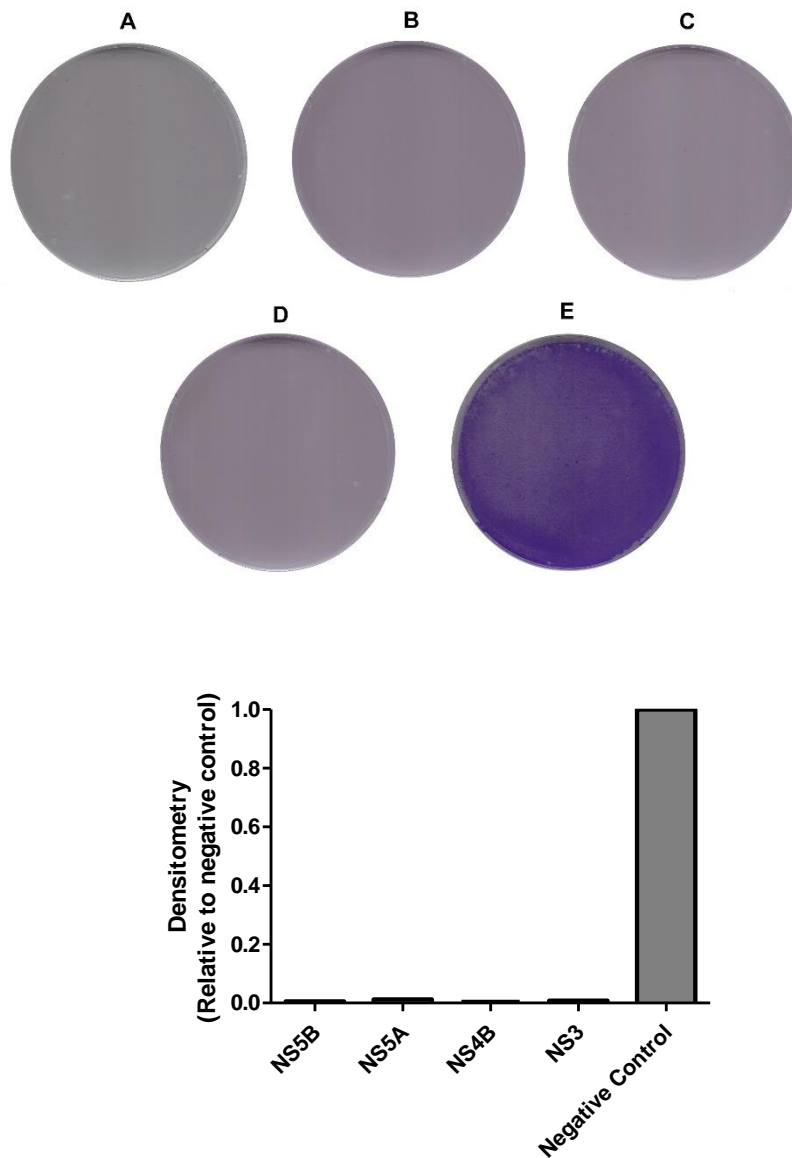


Figure 6. A - SGR-JFH FEO cells were transfected with 5 nM of DsiRNA directed to the NS5B region (A), NS3 (B), NS4B (C), NS5A (D) or negative control (E). Twenty-four hours after transfection, selective media (1 mg/mL G418) were added to the wells. After 5 days, cells were transfected again and selection conditions were maintained for 21 days. After selection time, cells were fixed and stained with Crystal violet. B - Densitometric analysis of long term assay plates. The values represented are the ratio between the plates treated for HCV DsiRNAs and plate treated with the negative control (set to 1).

References

- AMAKO, Y. et al. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. **J Virol**, v. 83, n. 18, p. 9237-46, Sep 2009.
- 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.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 7, p. 1631-48, Jul 2000.
- 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. 13001-13014, 2002.
- CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 426-33, Jan 22 2009.
- CHEVALIER, C. et al. Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. **Mol Ther**, v. 15, n. 8, p. 1452-62, Aug 2007.
- DUBUISSON, J.; PENIN, F.; MORADPOUR, D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 517-23, Nov 2002.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev**, v. 15, n. 2, p. 188-200, Jan 15 2001.
- ELBASHIR, S. M. et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO J**, v. 20, n. 23, p. 6877-88, Dec 3 2001.
- 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.
- FRASER, C. S.; DOUDNA, J. A. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 29-38, Jan 2007.
- HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11 2002.
- HARBORTH, J. et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 24, p. 4557-65, Dec 2001.
- HEZODE, C. Boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C: safety management in clinical practice. **Liver Int**, v. 32 Suppl 1, p. 32-8, Feb 2012.
- HOLLAND, J. J.; DE LA TORRE, J. C.; STEINHAEUER, D. A. RNA virus populations as quasispecies. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 176, p. 1-20, 1992.
- HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S21-9, Nov 2002.

KAPADIA, S. B.; BRIDEAU-ANDERSEN, A.; CHISARI, F. V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 2014-8, Feb 18 2003.

KIM, D. H. et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 222-6, Feb 2005.

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.

KORF, M. et al. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. **J Hepatol**, v. 43, n. 2, p. 225-34, Aug 2005.

LIU, M. et al. RNA Interference Effectively Inhibits mRNA Accumulation and Protein Expression of Hepatitis C Virus Core and E2 Genes in Human Cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, n. 9, p. 2049-2055, 2006.

LIU, X. et al. Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. **RNA**, v. 12, n. 8, p. 1514-20, Aug 2006.

LY, K. N. et al. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the United States between 1999 and 2007. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 4, p. 271-8, Feb 21 2012.

MACDONALD, A. et al. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 17775-84, May 16 2003.

NEYTS, J. Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. **Antiviral Res**, v. 71, n. 2-3, p. 363-71, Sep 2006.

ORBAN, T. I.; IZAURRALDE, E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 459-69, Apr 2005.

PICHU, S. et al. Dicer-substrate siRNA inhibits tumor necrosis factor alpha secretion in Kupffer cells in vitro: in vivo targeting of Kupffer cells by siRNA-liposomes. **Pharmacol Res**, v. 65, n. 1, p. 48-55, Jan 2012.

PRABHU, R.; GARRY, R. F.; DASH, S. Small interfering RNA targeted to stem-loop II of the 5' untranslated region effectively inhibits expression of six HCV genotypes. **Virology**, v. 3, p. 100, 2006.

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.

RANDALL, G.; GRAKOU, A.; RICE, C. M. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 1, p. 235-40, Jan 7 2003.

RUSTGI, V. K. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. **J Gastroenterol**, v. 42, n. 7, p. 513-21, Jul 2007.

SEN, A. et al. Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. **Virus Res**, v. 96, n. 1-2, p. 27-35, 2003.

THOMAS, X. V. et al. Evaluation of persistence of resistant variants with ultra-deep pyrosequencing in chronic hepatitis C patients treated with telaprevir. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41191, 2012.

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.

TSCHERNE, D. M. et al. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. **J Virol**, v. 80, n. 4, p. 1734-41, Feb 2006.

WILSON, J. A. et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5, p. 2783-8, Mar 4 2003.

WYLES, D. L. et al. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2660-2, Jun 2009.

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.

ZHOU, J. et al. Functional in vivo delivery of multiplexed anti-HIV-1 siRNAs via a chemically synthesized aptamer with a sticky bridge. **Mol Ther**, v. 21, n. 1, p. 192-200, Jan 2013.

Capítulo VI

6. Artigo II

Inibição do vírus da hepatite C por shRNA entregues por vetores lentivirais

Bruno Carneiro^{1,2}; Yutaka Amako²; Ana Cláudia Silva Braga¹; Mariana Nogueira Batista¹; Mark Harris^{2*}, Paula Rahal^{1*};

¹ - Laboratório de Estudo Genômicos, UNESP, IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² - School of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, UK.

* - Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho

Autor correspondente: prahal@ibilce.unesp.br

RESUMO – Estudos demonstram que aproximadamente 2,2% da população mundial está cronicamente infectada pelo HCV. No momento não existem vacinas eficazes e o tratamento convencional com peg-IFN e ribavirina tem eficácia bastante limitada e efeitos colaterais graves. Terapias moleculares utilizando a RNAi demonstraram ser eficientes na inibição deste vírus *in vitro*. Entretanto, nucleases presentes no soro humano ou animal degradam facilmente as moléculas de RNAi. Portanto, novos métodos de entrega de siRNA e shRNA são necessários para ensaios *in vivo*. O objetivo deste estudo foi desenvolver um vetor lentiviral capaz de infectar células contendo um replicon subgenômico do HCV e entregar a sequência codificante de shRNAs desenhados para inibir o vírus. Quatro sequências de shRNA (1 controle negativo e três dirigidas para o genoma viral) foram clonadas em um vetor lentiviral auto-inativante contendo um promotor CMV. Os alvos dos shRNAs eram a região 5' UTR (2 moléculas) e a sequência codificante da proteína NS5A. Células HEK 293T foram transfectadas com os seguintes plasmídeos: plasmídeo envelope (pCMV-VSV-G-RSV) – contendo a proteína de envelope do VSV-G, plasmídeo de empacotamento (pCAG-HIVgp) e o vetor lentiviral (CS-RfA-EG – contendo as proteínas *gag, pol*). O sobrenadante das células foi coletado 48 h e 72 h após a transfecção, centrifugado e utilizado para infectar a linhagem estável SGR-FEO-JFH-1 contendo replicon subgenômico do HCV e o gene sinalizador *firefly luciferase*. Dois dias após a infecção as células foram lisadas para ensaio de luciferase ou fixadas para imunofluorescência. Resultados demonstraram que a replicação do HCV pode ser reduzida em 99% (relativa ao controle negativo) por meio da infecção dos vetores lentivirais. Estudos *in vivo* ainda são necessários, entretanto a entrega de shRNAs por vetores lentivirais demonstrou ser uma ferramenta promissora para a terapia do HCV.

Palavras-chave: vírus da hepatite C, RNAi, vetor lentiviral, shRNA.

6.1. Introdução

A hepatite C é causada pela infecção com o vírus da hepatite C (HCV). Estima-se que no momento aproximadamente 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas em todo o mundo (POL et al., 2012). O HCV foi classificado como membro da família *Flaviviridae* sendo um vírus envelopado relativamente pequeno com genoma de RNA de fita simples positiva (BARTENSCHLAGER; FRESE; PIETSCHMANN, 2004). O RNA viral codifica uma poliproteína que é clivada pós-traducionalmente por proteases virais e celulares dando origem a proteínas estruturais (Core, E1, E2 e P7) e não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (GIANNINI; BRECHOT, 2003; BARTENSCHLAGER; FRESE; PIETSCHMANN, 2004).

O tratamento convencional para a infecção crônica pelo HCV consiste na administração de interferon peguilado (peg-IFN) e ribavirina (RBV) entretanto, dependendo do genótipo do vírus, a resposta viral sustentada é de apenas 50% dos pacientes tratados (GHANY et al., 2009). Novos inibidores de protease virais como o boceprevir e telaprevir possuem uma resposta sustentada relativamente melhor quando combinados à terapia convencional porém, foi demonstrado que este tipo de terapia tem graves efeitos colaterais (TALWANI et al., 2012). Portanto, a identificação de novas drogas e tratamentos mais efetivos são necessários. Ensaios utilizando a interferência por RNA (RNAi) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que este mecanismo molecular possui um grande potencial para o tratamento de diversas infecções virais (ASHFAQ et al., 2011).

A via de RNAi é um processo pós-transcricional de silenciamento gênico inicialmente identificado em nematódeos (FIRE et al., 1998) e posteriormente descrito em todos eucariotos (HANNON, 2002). Desde a sua descoberta, esse mecanismo vem sendo utilizado como uma importante ferramenta para estudos de funções gênicas e um potencial agente terapêutico (HARBORTH et al., 2001; CASTANOTTO; ROSSI, 2009). A molécula funcional da RNAi é o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que é responsável pela quebra de RNAs mensageiros contendo sequências específicas. A especificidade desta reação é proveniente por uma fita de RNA liga ao complexo RISC complementar a sequência do mRNA alvo. Esta fita de RNA complementar é produzida a partir da digestão de um RNA de fita dupla (dsRNA) pela endonucleases DICER (ELBASHIR et al., 2001). A via da RNAi pode ser ativada experimentalmente por meio da transfecção *in vitro* ou *in vivo* de moléculas sintéticas de siRNA (short interfering

RNA), shRNA (short hairpin RNA) (ELBASHIR et al., 2001) ou DsiRNA (dicer substrate siRNA) (KIM et al., 2005).

Alguns trabalhos demonstraram que a replicação do HCV pode ser efetivamente inibida em modelos de replicação subgenômico ou com modelo de partículas virais produzidas em cultura de células HCVcc utilizando-se moléculas de siRNA ou shRNA com sequências específicas para o genoma viral (KAPADIA; BRIDEAU-ANDERSEN; CHISARI, 2003; RANDALL; GRAKOU; RICE, 2003; ZEKRI et al., 2009). Apesar de ser eficiente em sistemas *in vitro* a terapia com RNAi possui algumas limitações *in vivo*. Foi demonstrado que as moléculas de siRNA desprotegidas quando administradas em animais são susceptíveis a nucleases presentes no soro, rapidamente degradadas nos rins e possuem uma biodistribuição não específica. Todos estes fatores fazem com que a meia-vida destas moléculas seja de apenas alguns minutos no soro e portanto a eficiência de tratamento pode ser seriamente afetada. Atualmente a grande problemática na terapia com RNAi é a forma de entrega destas moléculas de siRNA nas células alvo *in vivo* (GAO; LIU; LI, 2011). Uma das estratégias que vem sendo testada para solucionar este problema é a utilização de vetores virais para levar eficientemente as moléculas de siRNA/shRNA para o interior das células alvo (SETH; JOHNS; TEMPLIN, 2012).

Partículas lentivirais derivadas do HIV-1 para entrega de moléculas de RNAi vem sendo testadas e otimizadas nas últimas duas décadas e são um dos sistemas de entrega viral mais promissores (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012). Os vetores lentivirais possuem algumas propriedades ideais para serem utilizados como carreadores: expressão estável do gene transportado por meio da integração no genoma da célula alvo; capacidade de infecção em células diferentes etapas do ciclo celular (NALDINI et al., 1996); amplo tropismo celular (AKKINA et al., 1996); proteínas virais não são expressas após a transdução do vetor (IWAKUMA; CUI; CHANG, 1999); perfil de integração em localizações seguras (MONTINI et al., 2006); fácil manipulação e produção (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012). Todas as estas características fazem com que os vetores lentivirais sejam ideais para o transporte de moléculas de RNAi.

Neste trabalho, foram desenvolvidos três vetores lentivirais para a entrega de gene codificantes de moléculas de shRNA direcionadas para duas diferentes regiões do genoma do HCV. Utilizando dois destes vetores nós demonstramos que a replicação do HCV pode ser reduzida em mais de 99% em relação ao controle negativo em um sistema de replicação sub-genômico (SGR-FEO-JFH-1) contendo as proteínas não estruturais do vírus.

6.2. Materiais e métodos

Plasmídeos

Plasmídeos para a construção do vetor viral: pENTR4-H1(Riken BRC) – Vetor de entrada (doador) para o sistema de clonagem Gateway® (Life Technologies); pCAG-HIVgp (Riken BRC) – Plasmídeo de empacotamento do Sistema lentiviral, genes acessórios (vif, vpr, vpu, and nef) e regulatórios (tat and rev) do vírus foram removidos. Estão presentes nesta construção apenas os genes estruturais gag e pol; pCMV-VSV-G-RSV-Rev (Riken BRC) – Plasmídeo de empacotamento do Sistema lentiviral contendo o gene Rev do HIV e a proteína de envelope do VSV-G; CS-RfA-E G (Riken BRC) – Vetor de expressão lentiviral. Nesta construção estão incluídos os promotores virais, de expressão do shRNA e o gene repórter GFP.

Sistema sub-genômico HCV: O SGR-JFH FEO é um replicon subgenômico bicistrônico baseado no genótipo 2a, isolado JFH-1 do vírus da hepatite C (HCV) e contém o gene sinalizador *firefly luciferase* fundido ao gene de resistência a neomicina (FEO). Esta construção foi utilizada para a produção de linhagem estável.

Cultura de células

Células renais embrionárias humanas HEK 293T e células derivada de hepatócitos humanos Huh7.5 foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), 1% de aminoácido não essenciais (Life Technologies), 100 UI/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina (Life Technologies) à 37 °C, 5% CO₂ em uma estufa umidificada. Linhagens estáveis foram mantidas com 800 ug/mL de G418 (Sigma-aldrich).

Construção de Linhagem estável subgenômica HCV

A linhagem estável contendo o replicon subgenômico do HCV foi feita a partir do RNA transcrito a partir do DNA linearizado com XbaI (NEB) contendo a contendo a sequência codificante da poliproteína do JFH-1 utilizando o T7 Ribomax Express kit (Promega) após linearização do DNA com XbaI (NEB). O RNA transcrito foi eletroporado em

células Huh7.5 seguindo protocolo descrito na literatura (AMAKO et al., 2009). Resumidamente, células Huh7.5 foram ressuspensas em tampão Cytomix (VAN DEN HOFF; MOORMAN; LAMERS, 1992) na densidade de 1×10^7 células/mL e 400 μ L desta suspensão celular foi transferida para uma cubeta de eletroporação contendo 10 μ g do RNA transcrito. A eletroporação foi feita utilizando um eletroporador *Gene Pulser Xcell electroporation system* (Bio-rad) nas condições de 270 V por 25 ms no modo *square wave*. Para a produção da linhagem estável, as células transfectadas foram tratadas com 1 mg/mL de G418 a partir de dois dias após a eletroporação até que se pudesse observar a formação de colônias.

Clonagem do vetor lentiviral

Dois oligos complementares de DNA contendo 71 nt foram sintetizados (Sigma Aldrich). Os oligos foram anelados à 94°C seguido de resfriamento lento até temperatura ambiente e tratados com T4 quinase (NEB) para fosforilação do duplex de DNA. Em seguida o DNA foi purificado em gel de poliácridamida e clonado no vetor de entrada pENTR4-H1. A sequência codificante do shRNA foi transferida do vetor de entrada para o vetor de expressão de shRNA (CS-RfA-EG) utilizando a tecnologia de transferência por recombinação Gateway (Life Technologies). Para confirmação da identidade e qualidade da sequência clonada, os plasmídeos purificados foram sequenciados com o primer H1 e analisados.

Transfecção de células 293T para produção dos vetores virais

Aproximadamente 1×10^6 de células HEK 293T foram semeadas em placas de cultura com 10 cm de diâmetro e incubadas em estufa de cultura de células por 24 horas. No dia seguinte 7,5 μ g do plasmídeo CS-RfA-EG, 4,4 μ g de pCAG-HIVgp e 4,4 μ g de pCMV-VSV-G-RSV-Rev foram transfectados com o agente de transfecção *polyethylenimine* (PEI) na proporção de 5 μ L de PEI para 1 μ g de DNA. O sobrenadante contendo os vetores virais (LVs) foi coletado 48 h e 72 h após a transfecção. Após as coletas o sobrenadante foi centrifugado por 5 minutos à 1000 xg para remoção de restos celulares, filtrado em membrana de 0,22 μ m e armazenado em alíquotas em freezer -80°C até uso posterior.

Titulação das partículas infecciosas

Para determinação do título viral do sobrenadante contendo os vetores lentivirais, aproximadamente 8×10^3 células 293T foram semeadas em uma placa de 96 orifícios e incubadas em estufa de cultura de células. No dia seguinte o meio de cultura foi removido e substituído por diluições seriadas ($10^0 - 10^{-6}$) do sobrenadante contendo os diferentes vetores virais. Quatro horas após a infecção o sobrenadante viral foi removido e substituído por meio de cultura completo e a placa foi incubada por mais 48 h. Após o período de incubação o meio de cultura das células foi removido e substituído por PBS. As células foram examinadas sob microscópio de fluorescência para a detecção da presença da proteína sinalizadora eGFP (*enhanced green fluorescent protein*). O título viral foi obtido por meio da contagem do número de focos fluorescentes por diluição e os valores expressos em unidades formadoras de foco (ffu)/mL.

Infecção de células da linhagem estável com vetor lentiviral

Com o objetivo de se determinar se os vetores lentivirais eram capazes de reduzir a replicação do HCV, aproximadamente 3×10^4 células da linhagem estável SGR-FEO-JFH-1 foram semeadas em uma placa de 24 orifícios e incubadas em estufa de cultura de células. No dia seguinte o meio de cultura foi removido e substituído pelo volume apropriado de sobrenadante contendo os vetores virais de forma que o M.O.I (*multiplicity of infection*) fosse igual a 15 em todos os orifícios. No dia seguinte à infecção o meio de cultura foi trocado por meio de cultura completo e as placas foram incubadas por mais 48 h. Ao fim do tempo de incubação, as células foram lisadas para o ensaio de luciferase ou fixadas com paraformaldeído para realização de imunofluorescência.

Imunofluorescência

A expressão de proteínas do HCV das células SGR-FEO-JFH-1 tratadas com os LVs shRNAs contra o vírus foi avaliada por imunofluorescência contra a proteína NS5A. Resumidamente, após o tempo de incubação adequado as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e incubadas por duas horas com o anticorpo primário contra a proteína NS5A na diluição final de 1:500 à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com o anticorpo secundário apropriado conjugado com Alexa Fluor 595 e novamente a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente.

Por fim as células foram novamente lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência sob o comprimento de onda adequado.

Ensaio de luciferase

As células foram lisadas com a adição de 100 uL de tampão passivo de lise (PLB – Promega). Vinte e cinco microlitros do lisado celular foi transferido para uma placa branca de 96 orifícios específica para ensaio de luciferase. Em seguida, 50 uL do substrato de luciferase (Luciferase Assay System, Promega) foi automaticamente adicionado à placa e os níveis de luciferase lidos em um leitor BMG plate reader (BMG Labtech GmbH).

6.3. Resultados e Discussão

Desde a primeira descrição em 1998 (FIRE et al., 1998) a interferência por RNA demonstrou ser uma importante ferramenta para biologia molecular e terapia genica. Essa tecnologia já foi utilizada com sucesso para inibição da propagação viral em modelos *in vitro* e *in vivo* (HAASNOOT; WESTERHOUT; BERKHOUT, 2007). O vírus da hepatite c (HCV) é um importante candidato ao tratamento com esse tipo de ferramenta molecular já que não existe uma terapia eficiente para a infecção por este vírus em humanos. Os principais problemas da terapia convencional são a rápida seleção de variantes resistentes e a intensidade dos efeitos colaterais nos pacientes. Portanto, novas abordagens terapêuticas vem sendo testadas para o tratamento da infecção pelo HCV, dentre elas a interferência por RNAi demonstrou resultados promissores (ASHFAQ et al., 2011).

Para desenvolver moléculas de shRNA que sejam capazes de inibir a replicação do HCV, a sequência do vírus, genótipo 2a isolado JFH-1 foi triada quanto a alvos potenciais utilizando-se do web software siDirect 2.0 (NAITO et al., 2009). Foram identificados aproximadamente 20 alvos e destes, três regiões foram escolhidas para síntese dos oligos. Os critérios de inclusão dos sítios alvo no estudo foram: pontuação obtida no software, a homologia da região com outros genótipos do HCV e distribuição espacial das moléculas no genoma. Uma quarta molécula contendo sequência não específica para nenhum gene viral ou celular foi escolhida como controle negativo. Foram desenvolvidas duas moléculas para a região não traduzível 5' UTR (Tabela 1) já que esta posição é a mais conservada do genoma do vírus (HAN et al., 1991) e portanto está menos

sujeita a ocorrência de mutações no sítio alvo das moléculas de RNAi. Mutações de apenas 1 base nucleotídica são capazes de reduzir a eficiência do tratamento com siRNAs (KONISHI et al., 2006) e conseqüentemente a escolha de sítios conservados é altamente recomendada. O terceiro alvo escolhido está localizado na sequência codificante da proteína NS5A que ao contrário da 5' UTR é uma região de alta variabilidade genética e a sua inclusão no estudo se deu exclusivamente devido as propriedades bioquímicas da região que *in silico* demonstraram ser um bom alvo para silenciamento gênico (AMARZGUIOUI; PRYDZ, 2004; UI-TEI et al., 2004).

Durante a etapa de escolha dos sítios alvos dos shRNAs não foi levada em conta a função da proteína alvo para o ciclo replicativo do vírus. Para vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva, que codificam uma poliproteína como HCV (DUBUISSON; PENIN; MORADPOUR, 2002) a função da proteína contida na região codificadora é irrelevante. Estudos com *D. melanogaster* demonstraram que após a quebra inicial do mRNA alvo pelo complexo RISC, o restante da molécula de mRNA é rapidamente degradada, na posição 5' por exossomos e na porção 3' pela nuclease XRN1 (ORBAN; IZAURRALDE, 2005). Portanto, no caso do HCV, após a quebra inicial do RNA viral pelo complexo RISC, todo o genoma é degradado no citoplasma e conseqüentemente não haverá transcrição ou tradução. Por isto, ao contrário do que ocorre com outros vírus (XIANGJI et al., 2011; RAMIREZ-CARVAJAL; LONG, 2012), durante a fase da escolha das regiões alvo é importante focar-se apenas nas características físico-químicas da região e não na importância daquele sítio para o ciclo replicativo viral.

Um dos maiores problemas na terapia utilizando RNAi é a ausência de um método de entrega seguro e eficiente de moléculas siRNA. Neste projeto desenvolvemos um sistema de siRNA baseado em um vetor lentiviral, no qual um shRNA era expresso sob o controle de um promotor humano H1. Para isto, um promotor H1 foi clonado em um plasmídeo de entrada (pENTR4-H1) e os oligonucleotídeos contendo a sequência específica contra o RNA do HCV foi inserida neste plasmídeo após o promotor H1. Posteriormente, o cassette contendo o promotor H1 e o shRNA foi transferido para um vetor lentiviral auto-inativante (CS-RFA-EG). Nos vetores auto-inativantes, as regiões LTR (long terminal repeat) nas posições 5' e 3' do transgene são modificadas, na posição 5' a região U3 foi substituída por um promotor CMV e no LTR na posição 3' a região U3 foi parcialmente deletada (YU et al., 1986). Como resultado, os transcritos virais não possuem sequências U3 completas. Estas modificações impedem que a sequência integrada seja replicada e inserida em novas partículas virais; a ativação de oncogenes

como resposta à integração ao genoma e utilização das sequências integradas em caso de infecção por um vírus selvagem com capacidade de replicação (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012).

Com o intuito de produzir partículas lentivirais capazes de expressar shRNA, células de empacotamento 293T foram transfectadas com o plasmídeo de empacotamento contendo: os genes *gag*, *pol* e genes acessórios, plasmídeo de envelope, contendo a glicoproteína do VSV-G (*Vesicular stomatitis virus*) para maior tropismo e o vetor viral contendo o transgene, LTRs e proteína sinalizadora de empacotamento. Após 48 h, quando examinadas em microscópio de fluorescência, aproximadamente 90-95% das células estavam expressando a proteína fluorescente GFP (Figura 1), utilizada como um marcador de expressão dos plasmídeos transfectados. Esta observação nos permitiu concluir que a eficiência de transfecção com PEI foi alta fato que se deve provavelmente à característica da célula de empacotamento utilizada. As células HEK 293T são facilmente transfectadas e a presença do gene *SV40 large T antigen* que permite que plasmídeos transfectados sejam facilmente replicados (DUBBRIDGE et al., 1987). Apesar de ter sido demonstrado que os plasmídeos estavam sendo efetivamente expressos nas células foi necessário verificar se os vetores virais estavam sendo efetivamente produzidos e liberados das células e também o título destes vetores no sobrenadante celular. Células 293T foram infectadas com diluições seriadas do sobrenadante coletado e analisadas quanto a expressão da proteína sinalizadora GFP. Após 48 h foi verificada a presença de aproximadamente 10 focos de infecção na diluição de 10^{-4} o que nos permitiu determinar que o título viral era de aproximadamente 1×10^6 ffu/mL.

Após a confirmação que os LVs estavam efetivamente sendo produzidas, era necessário saber se os LVs eram capazes de infectar células derivadas de hepatocarcinoma humano (Huh7.5). Para isto a linhagem estável SGR-FEO-JFH-1 foi infectada com os LVs à uma multiplicidade de infecção próxima a 15. Após 48 h foi possível observar a expressão da proteína sinalizadora GFP em praticamente todas as células (Figura 2), sugerindo que a linhagem utilizada é permissiva e susceptível à infecção pelos LVs. Originalmente os lentivirus são bastante restritos quanto as células que são capazes de infectar a exemplo da espécie protótipo desde gênero, HIV, que é capaz de infectar somente células CD4+. Esta alta especificidade não é desejável nas partículas LVs já que ficariam bastante restritos à determinado tipo celular. Este problema foi resolvido a partir da substituição da proteína *env* do HIV pela proteína de ligação do VSV-G (AKKINA et al., 1996). O VSV-G possui um tropismo celular mais amplo que o

HIV (COIL; MILLER, 2004), permitindo com que os LVs produzidos com a proteína de envelope deste vírus sejam capazes de infectar uma variedade maior de células. Portanto, esta modificação permitiu que praticamente todas as células da linhagem estável SGR-FEO-JFH-1 fossem infectadas pelas LVs produzidas neste estudo.

Finalmente foi necessário verificar se a replicação do HCV era efetivamente reduzida após a infecção com as LVs. Para isto, a linhagem SGR-FEO-JFH-1 foi infectada com as quatro diferentes LVs e, após 48 h as células foram lisadas e o conteúdo intracelular de luciferase era medido ou eram fixadas para a reação de imunofluorescência. A análise da expressão de proteínas por imunofluorescência demonstrou que as células não infectadas ou infectadas com o controle negativo expressavam a proteína NS5A em grande quantidade (Figura 3). Foi observado que as quatro construções lentivirais foram capazes de infectar as células alvo, como observado pela expressão de GFP em virtualmente todas as células observadas. Ainda, as células infectadas com os vetores H_IRES e B_NS5A reduziram a expressão da NS5A ao contrário da construção B_IRES que possuía níveis de expressão da proteína viral semelhantes ao observado no controle negativo.

Os resultados da imunofluorescência foram corroborados pela reação de luciferase que demonstrou que apenas dois dos três shRNAs foram capazes de inibir a replicação do HCV. A molécula com melhor resultado, denominada H_IRES, foi capaz de inibir a replicação do HCV em 99%, já o shRNA direcionado para região codificante da proteína NS5A, B_NS5A, reduziu a replicação viral em aproximadamente 85% em relação ao controle negativo (Figura 4). A terceira molécula também direcionada para a região 5' UTR, denominada B_IRES, reduziu a replicação viral em apenas 15% em relação ao controle. Alguns outros trabalhos demonstraram níveis semelhantes de inibição do HCV a partir da transfecção de siRNAs em células contendo replicons para o HCV (CHEVALIER et al., 2007; TREJO-AVILA et al., 2007; ZEKRI et al., 2009). Outros estudos analisaram a eficiência de inibição do HCV utilizando diferentes moléculas de siRNA para a região 5' UTR tiveram resultados semelhantes ao observado neste trabalho, no qual algumas moléculas desenhadas para esta região foram eficientes na inibição enquanto outras tiveram resultado negativo (YOKOTA et al., 2003; ZEKRI et al., 2009). A principal hipótese para explicar este fenômeno é a característica física da região 5' UTR que contém quatro domínios altamente estruturados, numerados de I a IV, contendo várias voltas e pseudo-nós (BROWN et al., 1992; WANG et al., 1995) e esta propriedade talvez

possa explicar a baixa eficiência de inibição do shRNA B_IRES já que a molécula de siRNA seria fisicamente incapaz de se ligar ao seu sítio alvo.

Neste trabalho nós desenvolvemos 3 moléculas de shRNA que foram entregues em células alvo a partir de vetores lentivirais auto-inativantes. Destas, 2 moléculas demonstraram ser capazes de inibir a replicação do HCV em mais de 99% e poderão ser utilizadas no futuro como uma forma de terapia alternativa para pacientes com infecção crônica pelo HCV. Entretanto, ainda são necessários alguns estudos como o surgimento de variantes de resistentes ao tratamento com estes shRNA e testes de imunogenicidade em modelos *in vivo*. Ainda, a utilização de vetores virais para a entrega das moléculas de shRNA demonstrou ser altamente eficiente e é uma boa resposta aos principais problemas com a entrega de siRNAs *in vivo* entretanto, são necessários mais testes para verificar a segurança biológica destas moléculas.

Tabelas

Nome	Alvo	Genótipo	Posição	Sequencia
H_SCBL	-	-	-	5' –GCGCGCTTTGTAGGATTCG– 3' 5' –CGAATCCTACAAAGCGCGC– 3'
H_IRES	5' UTR	1,2,3,4,5,6	320-338	5' –AGGTCTCGTAGACCGTGCA– 3' 5' –TGCACGGTCTACGAGACCT– 3'
B_IRES	5' UTR	1,2,3,4,5,6	279-297	5' –CTTGTGGTACTGCCTGATA– 3' 5' –TATCAGGCAGTACCACAAG– 3'
B_NS5A	NS5A	2a	4989-5007	5' –GTCGTACTCCTATGTAACA– 3' 5' –TGTTACATAGGAGTACGAC– 3'

Figuras

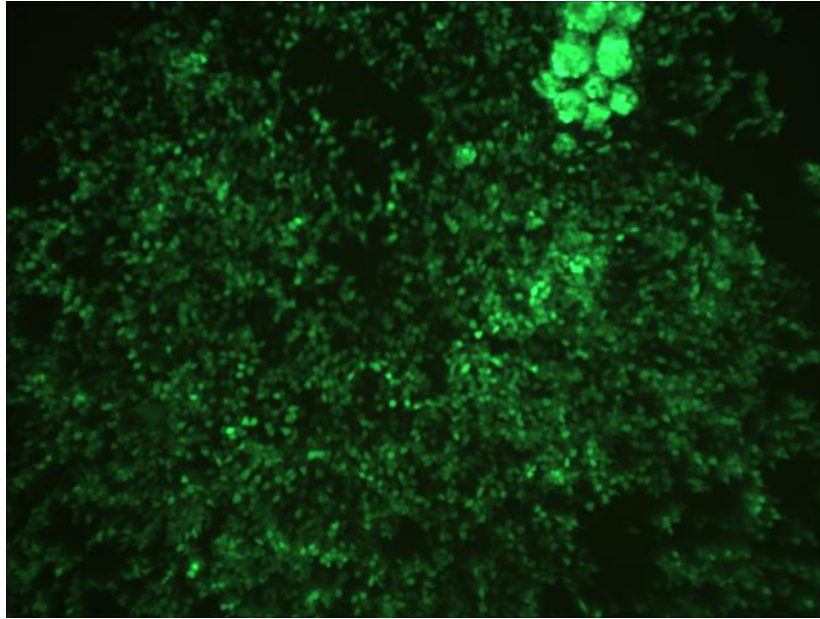


Figura 1. Células 293T foram transfectadas com os plasmídeos pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev e CS-RfA-EG (contendo o gene sinalizador GFP) para produção de partículas lentivirais carregando shRNAs contra o genoma do HCV. Imagem capturada 48h após a transfecção.

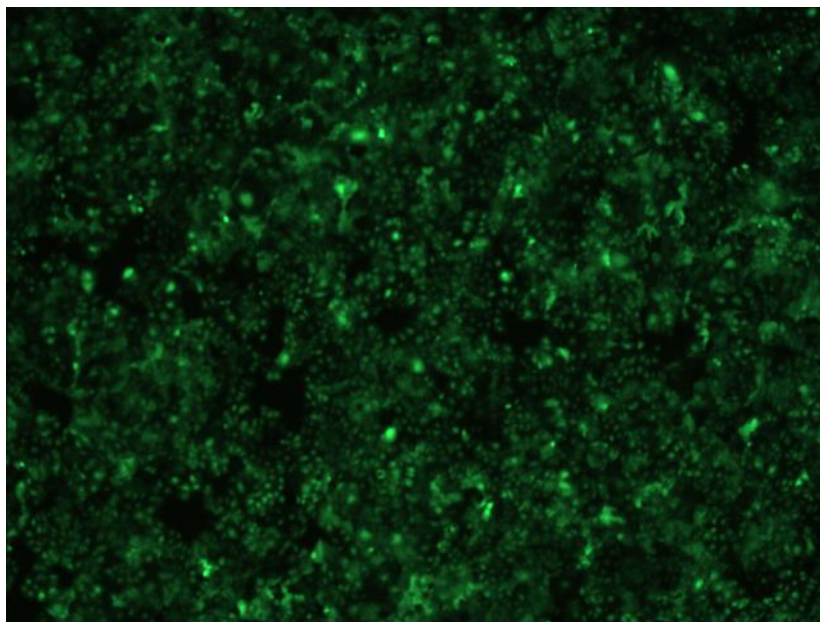


Figura 2. Células Huh7.5 foram infectadas com a vetor lentiviral à um M.O.I de 15. Dois dias após a infecção as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e observadas em microscópio de fluorescência.

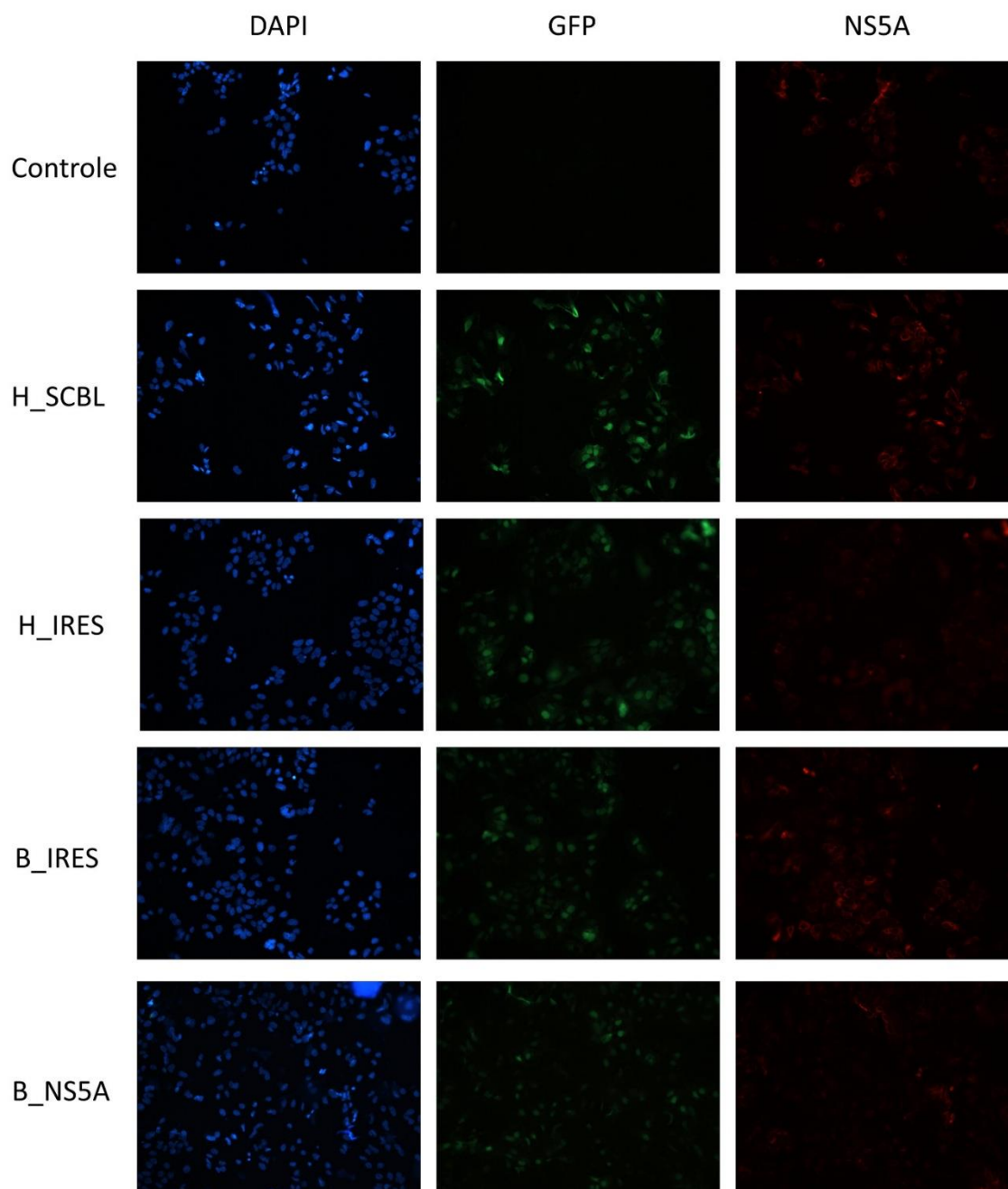


Figura 3. Células SGR-JFH1 FEO foram infectadas com os quatro vetores lentivirais e analisadas 48 h após a infecção. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com anticorpo primário anti-NS5A e anticorpo secundário Alexa Fluor 594. As células foram tratadas com DAPI e observadas em microscópio de fluorescência. Cada coluna representa o mesmo campo de observação sob excitação em diferentes comprimentos de onda.

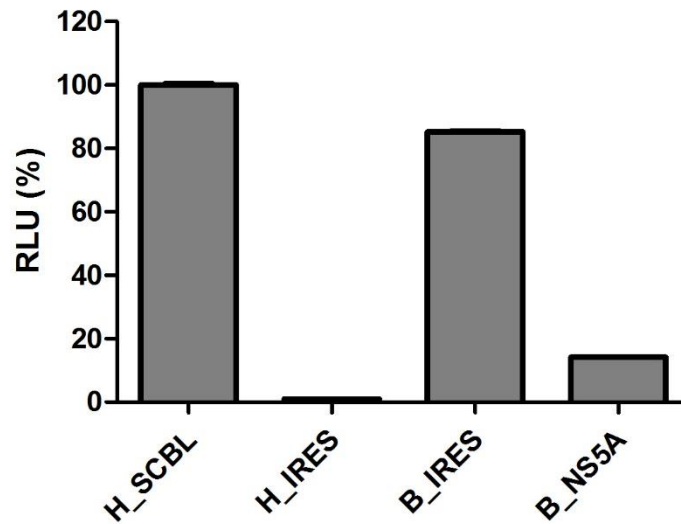


Figura 4. Células SGR-JFH1 FEO foram infectadas com os vetores lentivirais e analisadas 48h após a infecção por meio da medição dos níveis de luciferase nos lisados celulares. Os valores estão apresentados como porcentagem da atividade de luciferase em relação ao controle negativo (H_SCBL).

Referências

- AKKINA, R. K. et al. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. **J Virol**, v. 70, n. 4, p. 2581-5, Apr 1996.
- AMAKO, Y. et al. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. **J Virol**, v. 83, n. 18, p. 9237-46, Sep 2009.
- AMARZGUIOUI, M.; PRYDZ, H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 4, p. 1050-8, Apr 16 2004.
- ASHFAQ, U. A. et al. siRNAs: potential therapeutic agents against hepatitis C virus. **Virol J**, v. 8, p. 276, 2011.
- BARTENSCHLAGER, R.; FRESE, M.; PIETSCHMANN, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. **Adv Virus Res**, v. 63, p. 71-180, 2004.
- BROWN, E. A. et al. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 19, p. 5041-5, Oct 11 1992.
- CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 426-33, Jan 22 2009.
- CHEVALIER, C. et al. Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. **Mol Ther**, v. 15, n. 8, p. 1452-62, Aug 2007.
- COIL, D. A.; MILLER, A. D. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. **J Virol**, v. 78, n. 20, p. 10920-6, Oct 2004.
- DUBRIDGE, R. B. et al. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. **Mol Cell Biol**, v. 7, n. 1, p. 379-87, Jan 1987.
- DUBUISSON, J.; PENIN, F.; MORADPOUR, D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 517-23, Nov 2002.
- ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-8, May 24 2001.
- 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.
- GAO, Y.; LIU, X. L.; LI, X. R. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1017-25, 2011.
- GHANY, M. G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1335-74, Apr 2009.

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

HAASNOOT, J.; WESTERHOUT, E. M.; BERKHOUT, B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 12, p. 1435-43, Dec 2007.

HAN, J. H. et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 5, p. 1711-5, Mar 1 1991.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11 2002.

HARBORTH, J. et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 24, p. 4557-65, Dec 2001.

IWAKUMA, T.; CUI, Y.; CHANG, L. J. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. **Virology**, v. 261, n. 1, p. 120-32, Aug 15 1999.

KAPADIA, S. B.; BRIDEAU-ANDERSEN, A.; CHISARI, F. V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 2014-8, Feb 18 2003.

KIM, D. H. et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 222-6, Feb 2005.

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.

MONTINI, E. et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 6, p. 687-96, Jun 2006.

NAITO, Y. et al. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 392, 2009.

NALDINI, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263-7, Apr 12 1996.

ORBAN, T. I.; IZAURRALDE, E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 459-69, Apr 2005.

POL, S. et al. Hepatitis C: epidemiology, diagnosis, natural history and therapy. **Contrib Nephrol**, v. 176, p. 1-9, 2012.

RAMIREZ-CARVAJAL, L.; LONG, C. R. Down-regulation of viral replication by lentiviral-mediated expression of short-hairpin RNAs against vesicular stomatitis virus ribonuclear complex genes. **Antiviral Res**, v. 95, n. 2, p. 150-8, Aug 2012.

RANDALL, G.; GRAKOU, A.; RICE, C. M. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 1, p. 235-40, Jan 7 2003.

SAKUMA, T.; BARRY, M. A.; IKEDA, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. **Biochem J**, v. 443, n. 3, p. 603-18, May 1 2012.

SETH, S.; JOHNS, R.; TEMPLIN, M. V. Delivery and biodistribution of siRNA for cancer therapy: challenges and future prospects. **Ther Deliv**, v. 3, n. 2, p. 245-61, Feb 2012.

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.

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.

UI-TEI, K. et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 3, p. 936-48, 2004.

VAN DEN HOFF, M. J.; MOORMAN, A. F.; LAMERS, W. H. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 11, p. 2902, Jun 11 1992.

WANG, C. et al. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. **RNA**, v. 1, n. 5, p. 526-37, Jul 1995.

XIANGJI, L. et al. Knockdown of HBV surface antigen gene expression by a lentiviral microRNA-based system inhibits HBV replication and HCC growth. **J Viral Hepat**, v. 18, n. 9, p. 653-60, Sep 2011.

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.

YU, S. F. et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 10, p. 3194-8, May 1986.

ZEKRI, A. R. et al. Consensus siRNA for inhibition of HCV genotype-4 replication. **Virol J**, v. 6, p. 13, 2009.

7. Considerações finais

A via do RNA de interferência foi descrita pela primeira vez há menos de 15 anos atrás. Desde a sua descrição inicial foi demonstrado que este mecanismo é relativamente conservado entre eucariotos e é utilizado naturalmente como um mecanismo de proteção à material genômico exógeno e no caso dos microRNAs tem função de regulamento gênico. A partir da sua identificação, essa tecnologia passou a ser uma importante ferramenta de biologia molecular e forte candidato à terapias de diversas doenças infecciosas, auto-imunes ou de alteração genética. Já foi demonstrado em estudos científicos que a replicação viral de diversas famílias de vírus podem ser reduzidas utilizando essa metodologia *in vitro* e *in vivo*. Apesar do relativo sucesso da RNAi alguns fatores ainda limitam a utilização de siRNAs na terapia em larga-escala em humanos.

O primeiro fator limitante é a ausência de um método de entrega das moléculas efetoras da RNAi no organismo. Como já descrito anteriormente, estas moléculas são rapidamente degradadas no soro e filtradas nos rins. Outro ponto, especialmente na terapia de doenças infecciosas, é a rápida seleção de mutantes resistentes ao tratamento, principalmente para infecções de vírus de RNA. Ainda existem outros fatores como desregulação da expressão de miRNAs, ativação da via do IFN e alto custo que restringem a utilização destas moléculas de forma terapêutica.

Neste trabalho nós apresentamos duas metodologias que podem ajudar a resolver algum dos fatores limitantes descritos. Com a utilização dos DsiRNA foi demonstrado que a replicação do HCV pode ser reduzida em 99% em relação ao controle não tratado. Essas moléculas também mostraram um efeito protetor à infecção pelo vírus, quando transfectadas nas células antes da infecção viral. Ainda, por ser uma molécula mais potente que os siRNAs convencionais de 21 nt, uma menor quantidade de DsiRNAs é necessária evitando portanto efeitos não específicos. Entretanto o resultado mais importante que que obtivemos com estas moléculas foi o fato que não foi observada a seleção de mutantes virais resistentes aos DsiRNAs mesmo após 21 dias de tratamento. Portanto a utilização de DsiRNAs pode resolver um dos grandes problemas na utilização da RNAi terapeuticamente e pode ser uma importante para a terapia antiviral, principalmente para vírus de RNA.

A utilização dos vetores lentivirais para a entrega de genes codificantes de shRNA foi outra metodologia testada com sucesso. Com este sistema nós conseguimos reduzir a

replicação viral em 99% após apenas 48 h da infecção com as LVs. Utilizando-se deste sistema de entrega, em teoria, as moléculas de siRNA estarão protegidas da degradação de endonucleases presente no soro dos animais e o processamento renal e hepático. Ainda, a utilização destes vetores permite que as sequências codificantes de shRNA sejam integradas de forma segura no genoma do hospedeiro e permite que as moléculas de siRNA sejam expressas por maior período. No futuro, a utilização de LVs poderão representar um importante meio de introdução de material genético em células alvo e poderá ser uma terapia alternativa ao tratamento convencional com drogas.

Apesar dos resultados apresentados serem animadores, estas técnicas ainda precisam ser testadas em alguns outros parâmetros. Por exemplo, devido à ausência de um modelo animal de simples manuseio para o HCV não foi possível testar as moléculas de DsiRNA contra o vírus *in vivo*. Pelo mesmo motivo não foi possível também testar um método de entrega destas moléculas *in vivo*. Por isto esperamos no futuro implantar um modelo quimérico como descrito anteriormente para testar os parâmetros acima descritos. Em relação aos vetores lentivirais, por motivos de biossegurança, não foi possível testar a eficiência destas construções em um contexto de vírus completo do HCV. Ainda alguns fatores precisam ser melhores esclarecidos como a segurança dos pontos de integração das moléculas de shRNA no genoma e o desenvolvimento de resposta imune pelo hospedeiro.

Portanto, acreditamos que em um futuro próximo a terapia genômica será uma alternativa importante no tratamento da infecção crônica pelo HCV e outros vírus, além de doenças genéticas e autoimunes.