



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

Ana Claudia Silva Braga

Regulação da expressão de proteínas de choque térmico pelo vírus da  
hepatite C

São José do Rio Preto  
2017

Ana Claudia Silva Braga

Regulação da expressão de proteínas de choque térmico pelo vírus da  
hepatite C

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

Financiadora: FAPESP – Proc: 2013/17253-9

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Rahal  
Coorientador: Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro

São José do Rio Preto  
2017

Braga , Ana Claudia Silva.

Regulação da expressão de proteínas de choque térmico pelo vírus da hepatite C / Ana Claudia Silva Braga. -- São José do Rio Preto, 2017

91 f. : il., tabs.

Orientador: Paula Rahal

Coorientadora: Bruno Moreira Carneiro

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Hepatite C. 3. Vírus. 4. Proteínas de choque térmico. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 578.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Claudia Silva Braga

## Regulação da expressão de proteínas de choque térmico pelo vírus da hepatite C

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

Financiadora: FAPESP – Proc: 2013/17253-9

### Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Rahal  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Maria Costa Nunes Soares  
ADOLFO LUTZ – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Maira Góes  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. João Bosco Guerreiro da Silva  
FAMERP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
04 de agosto de 2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de São José do Rio Preto



ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **ANA CLAUDIA SILVA BRAGA**, RA nº: 119562-4, RG nº 43.766.507-0, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 04/08/2017, a tese intitulada **Regulação da expressão de proteínas de choque térmico pelo vírus da hepatite C**, junto ao Programa de Pós Graduação em MICROBIOLOGIA, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

São José do Rio Preto, 04 de agosto de 2017

Rosemar Rosa de Carvalho Brena  
Supervisor Técnico de Defesa  
Seção Técnica de Pós-Graduação

## Epígrafe

Se você vai tentar, vá até o fim  
Caso contrário, nem comece

Se você vai tentar, vá até o fim  
Isso pode significar perder amores, amigos, empregos, talvez até a cabeça

Vá até o fim  
Isso pode significar três ou quatro dias sem comer  
Isso pode significar congelar em um banco de parque  
Isso pode significar deboche, rejeição, solidão  
Solidão, pense nela como uma dádiva  
Todo o resto é um teste de resistência  
Para ver o quanto você está disposto a tentar

E você vai fazer  
Apesar da rejeição e das menores chances  
E vai ser melhor que  
Qualquer outra coisa  
Que você possa imaginar

Se você vai tentar, vá até o fim  
Até o fim  
Não há sensação como essa.

"Jogue os dados"  
Charles Bukowski

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Raquel e Cláudio, meu irmão Fernando e meu namorado Arthur.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as graças e desafios que coloca em meu caminho, me ensinando a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais Raquel e Cláudio que sempre se dedicaram para eu tivesse a melhor educação possível. Agradeço também pelos princípios transmitidos que levarei comigo por toda vida. Amo vocês!

Ao meu irmão Fernando pelos conselhos e por toda força que sempre me deu, mesmo à distância como nesse último ano. Amo você!

Ao meu namorado e companheiro Arthur por todo amor, paciência, dedicação, cumplicidade, ajuda e compreensão que teve comigo durante todos esses anos. Descobrimos que juntos somos mais fortes. Te amo!

A todos os familiares, tios, tias, primos, primas, avós e amigos da família que sempre torceram por mim e pelas minhas conquistas.

A todos os docentes, pesquisadores, técnicos e funcionários do IBILCE pela dedicação em formar seus alunos. Agradeço também ao programa de pós-graduação em Microbiologia do instituto.

À minha orientadora Paula Rahal pela oportunidade de desenvolver toda minha carreira acadêmica em seu laboratório. Obrigada por ter me acolhido nessa equipe maravilhosa.

Ao meu co-orientador Bruno, que me acompanhou desde a iniciação científica, por TODOS os ensinamentos transmitidos. Você é um grande exemplo de competência e sucesso para mim.

À banca examinadora pelo tempo e disponibilidade desprendidos para contribuir com meu trabalho. A avaliação de vocês é extremamente importante para minha formação profissional e pessoal.

Aos irmãos de coração que o laboratório me deu, Renata, Mariana, Guilherme, Bruna e André. Com vocês a caminhada foi muito mais fácil.

Aos amigos e colegas do laboratório Genoma por terem me ajudado nessa empreitada. Em especial os que me acompanharam por mais tempo: Marina Dias, Rodolfo, Marilê, Bia, Rafael B., Rafael R., Gregory, Tairine, Carina, Fran, Lucas, Cíntia, Paola, Carol, Marília, Marina Valsechi, Miyuki e Lenira

Às minhas alunas Jacqueline e Mônica pela parceria e por fazerem parte de um aprendizado muito importante na minha vida.

Às minhas amigas/irmãs da faculdade Carol, Déia, Ju e Lari (ordem alfabética para não dar briga), por esses 10 anos de amizade e companheirismo. Amo vocês! Vou sentir saudades!

Aos meus amigos/irmãos da faculdade Plínio, Tadeu, Thiago, Batatais e Poatan, por 10 anos de muitas risadas.

Aos meus amigos de Taquaritinga, Livia, Mayara, Cintia, Thalita, Clara, Bela, Chula, Camila, Narco, Natália, Fer, Luiza, Amanda, Fábio, Gabo, Caio, Renato, Evandro, Pinça, Pity, Marinho e Du. Obrigada por me adotarem nessa família incrível.

Ao meu "cãopanheiro" Charlie por seu amor incondicional e pelos momentos de descontração. Mamãe te ama!

Aos meus caronas, em especial Raul, Ana Letícia, Bela, Marina, Livia, Savério e Carol. Nossas viagens foram muito mais agradáveis compartilhando nossas experiências e conselhos.

À todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram com meu trabalho e/ou minha formação profissional e pessoal.

Ao apoio financeiro da FAPESP (processo nº 2013/17253-9).

## Sumário

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| <i>Capítulo I - Considerações Gerais e Literatura</i> ..... | 18 |
| 1 Introdução.....                                           | 19 |
| 2 Levantamento Bibliográfico.....                           | 22 |
| 2.1 Histórico.....                                          | 22 |
| 2.2 Vias de transmissão.....                                | 22 |
| 2.3 Epidemiologia.....                                      | 23 |
| 2.3.1 Prevalência global.....                               | 23 |
| 2.3.2 Prevalência relacionada à idade e sexo.....           | 24 |
| 2.3.3 Prevalência genotípica do HCV.....                    | 25 |
| 2.4 Patologia.....                                          | 27 |
| 2.4.1 Infecção aguda pelo HCV.....                          | 27 |
| 2.4.2 Infecção crônica pelo HCV.....                        | 27 |
| 2.5 Tratamento.....                                         | 29 |
| 2.6 O vírus da Hepatite C.....                              | 30 |
| 2.6.1 Filogenia do vírus.....                               | 30 |
| 2.6.2 Morfologia.....                                       | 31 |
| 2.6.3 Material genético.....                                | 31 |
| 2.6.4 Funções das proteínas e regiões virais.....           | 32 |
| 2.6.5 Replicação viral.....                                 | 36 |
| 2.7 Ferramentas para o estudo do HCV.....                   | 38 |
| 2.8 Proteínas de choque térmico (HSP).....                  | 40 |
| 2.8.1 Pequenas proteínas de choque térmico.....             | 41 |
| 2.8.2 HSP40.....                                            | 41 |
| 2.8.3 HSP60.....                                            | 41 |
| 2.8.4 HSP70.....                                            | 42 |
| 2.8.5 HSP90.....                                            | 42 |
| 2.8.6 HSP100 e HSP110.....                                  | 42 |
| 2.8.7 HSPs e o HCV.....                                     | 43 |
| 3 Justificativa.....                                        | 44 |
| 4 Objetivos gerais.....                                     | 45 |
| 4.1 Objetivos específicos.....                              | 45 |
| 5 Referências Bibliográficas.....                           | 46 |
| <i>Capítulo II - Artigo Científico</i> .....                | 57 |
| 1 Introduction.....                                         | 59 |
| 2 Materials and methods.....                                | 60 |
| 2.1 Cell culture and HCV replicon cells.....                | 60 |

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 2.2 qPCR array to HSPs.....                               | 61 |
| 2.3 Validation of the results obtained by PCR Array ..... | 62 |
| 2.4 RNAi molecules and transfection .....                 | 62 |
| 2.5 Gene expression vectors .....                         | 62 |
| 2.6 Cell viability .....                                  | 63 |
| 2.7 RNA isolation and qPCR .....                          | 63 |
| 2.8 Luciferase assay .....                                | 64 |
| 2.9 Co-IP assay .....                                     | 64 |
| 2.10 Statistical analysis .....                           | 65 |
| 3 Results .....                                           | 66 |
| 3.1 qPCR array and validation of results.....             | 66 |
| 3.2 The role of HSPB8 gene in HCV replication.....        | 68 |
| 3.3 The role of DNAJC5B gene in HCV replication .....     | 70 |
| 3.4 Protein-protein interaction.....                      | 72 |
| 4 Discussion.....                                         | 74 |
| 5 References .....                                        | 77 |
| 6 Supplementary Material .....                            | 80 |
| Capítulo III - Conclusão.....                             | 81 |
| 1 Considerações finais.....                               | 82 |
| 2 Referências bibliográficas .....                        | 84 |
| Capítulo IV - Artigos Publicados .....                    | 85 |

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

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

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

NANB: hepatite não-a-não-b

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

NT: nucleotídeo

OMS: Organização Mundial da Saúde

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

Pb: par de bases

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

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

PEG: polietilenoglicol, do inglês *polyethylene glycol*

PEG-IFN: interferon peguilado

pH: potencial hidrogeniônico

pSGR-JFH1: replicon subgenômico, do inglês *subgenomic replicon Japanese Fulminant Hepatitis 1*

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

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

RBV: ribavirina

RE: retículo endoplasmático

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

RNA: ácido ribonucléico

RNAi: RNA de interferência

rpm: rotações por minuto

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

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

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

SFB: soro fetal bovino

shRNA: do inglês *short hairpin RNA*

siRNA: do inglês *short interfering RNA*

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

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

V: unidade de voltagem elétrica, Volt

## RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) causa a doença da Hepatite C e estima-se que cerca de 3% da população mundial esteja infectada com o vírus. A infecção por HCV promove a alteração na expressão de várias proteínas celulares. Estudos têm demonstrado que muitas proteínas de choque térmico (HSPs) possuem um perfil de expressão alterado na presença do vírus e algumas HSPs interagem diretamente com proteínas do HCV. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* os níveis de expressão de proteínas de choque térmico na presença e ausência de HCV. Com este propósito, células de hepatoma humano Huh7.5 e células Huh7.5 infectadas com o vírus (HCV JFH-1) foram submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA. A expressão diferencial de 84 HSPs e chaperonas foi avaliada por qPCR Array. Os resultados demonstram que cinco genes apresentaram expressão aumentada (em Log2 2), enquanto outros cinco apresentaram expressão reduzida. Para validar estes resultados os 10 genes diferencialmente expressos foram testados por qPCR em três modelos celulares para o HCV: células contendo replicon subgenômico do HCV (SGR-JFH-1), células infectadas com JFH-1 (ambos do genótipo 2a) e células contendo o replicon subgenômico S52 (genótipo 3). O gene HSPB8 mostrou expressão aumentada nos três modelos testados, condizente com os resultados obtidos por qPCR Array. Em seguida, promovemos o silenciamento de HSPB8 e foi observado um aumento na replicação viral. Em contraste, quando aumentamos a expressão de HSPB8, o HCV teve uma diminuição na taxa de replicação. O mesmo procedimento foi adotado para o gene DNAJC5B, validado no modelo viral genótipo 3, e o HCV mostrou padrão de replicação semelhante ao observado para o gene anterior. Esses resultados sugerem que HSPB8 pode atuar como um fator intracelular contra a replicação do vírus da hepatite C e DNAJC5B apresenta a mesma função, mas específico para o genótipo 3. Também avaliamos interações diretas com proteínas do HCV e os resultados demonstraram uma interação física entre a proteína NS4B de HCV e HSPB8. Esses resultados podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na replicação do HCV.

Palavras-chave: HCV, Hepatite C, JFH-1, SGR-JFH-1, S52, gentótipo 2a, genótipo 3, Proteínas de choque térmico, HSP, chaperonas, HSPB8, DNAJC5B, HSP22, CSP- $\beta$ .

## **ABSTRACT**

*Hepatitis C virus (HCV) causes Hepatitis C disease and it is estimated that about 3% of world population are infected with the virus. HCV infection promotes alteration in the expression of several cellular proteins. Studies have shown that many heat shock proteins (HSPs) have an altered expression profile in the presence of the virus and some HSPs interact directly with HCV proteins. Thus, the present study aimed to evaluate in vitro the expression levels of heat shock proteins in the presence and absence of HCV. With this purpose, human hepatoma Huh7.5 cells and Huh7.5 cells infected with the virus (HCV JFH-1) were subjected to RNA extraction and cDNA synthesis. The differential expression of 84 HSPs and chaperones was assessed by qPCR Array. The results demonstrate that five genes showed increased expression (over Log2 2), while five other presented reduced expression. To validate these results, the 10 differentially expressed genes were tested by real-time PCR in three different HCV cell culture models: subgenomic HCV replicon cells (SGR-JFH-1), JFH-1 infected cells (both genotype 2a) and subgenomic S52 cells (genotype 3). The HSPB8 gene showed increased expression in all of three tested models, consistent with qPCR Array results. Then we promoted the silencing of HSPB8 and observed an increase in viral replication. In contrast, when we increased an expression of HSPB8, HCV had a decrease in replication rate. The same procedure was adopted for the DNAJC5B, validated in the viral model genotype 3, and HCV showed replication pattern similar to that observed for the previous gene. These results suggest that HSPB8 may act as an intracellular factor against hepatitis C virus replication and DNAJC5B have the same function, but genotype 3 specific. We also evaluated direct interactions with HCV proteins and the results demonstrated a physical interaction between the HCV NS4B protein with HSPB8. These results can contribute for a better understanding of the mechanisms involved in HCV replication.*

*Key-words: HCV, Hepatitis C, JFH-1, SGR-JFH-1, S52, genotype 2a, genotype 3, Heat shock proteins, HSP, chaperones, HSPB8, DNAJC5B, HSP22, CSP- $\beta$ .*

## ***Capítulo I - Considerações Gerais e Literatura***

---

## 1 Introdução

A hepatite C é uma doença caracterizada por uma infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C (*hepatitis C virus* - HCV). Devido às suas graves consequências, é uma questão de saúde pública mundial, podendo evoluir para patologias graves como cirrose e hepatocarcinoma, fazendo da Hepatite C a principal responsável pelos transplantes de fígado. O perfil assintomático da doença dificulta a precisão dos estudos epidemiológicos, mas estimativas apontam que aproximadamente 3% da população mundial esteja infectada pelo HCV, porém esse número pode estar subestimado (MOHD HANAFIAH et al., 2013; THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017).

Uma outra consequência da doença ser assintomática é que a maioria dos pacientes portadores do vírus é diagnosticada após um longo período de tempo. Essa demora na descoberta muitas vezes acarreta em complicações no quadro clínico do paciente como a cirrose, a insuficiência hepática e até mesmo o câncer de fígado (hepatocarcinoma - HCC) (LIEBER, 2001). Essas alterações hepáticas graves podem estar relacionadas com o fato de que proteínas do HCV podem interagir com proteínas celulares responsáveis pelo controle do ciclo celular. Tais interações levam à desregulação desses ciclos, podendo promover o desenvolvimento de células tumorais (NGUYEN et al., 2003; SELIMOVIC et al., 2012).

O Interferon (IFN) ou o IFN peguilado (PEG-IFN) em combinação com ribavirina (RBV) foram os principais agentes farmacológicos para o tratamento de infecções por HCV. No entanto, apenas 30-40% dos indivíduos com o genótipo 1 e 70-90% daqueles com genótipo 2 e 3, tratados com PEG-IFN em associação com RBV, foram capazes de alcançar uma resposta virológica sustentada (RVS) (FRIED et al., 2002).

A partir de 2011 surgiram os antivirais de ação direta de primeira geração (*Direct-acting antivirals* - DAAs), boceprevir e telaprevir, que combinados com PEG-IFN e RBV aumentaram as taxas gerais de RVS para 68-75% para pacientes não tratados previamente e para 59-88% para pacientes já tratados (BACON et al., 2011). No entanto, a longa duração do tratamento (24 a 48 semanas) e a reduzida tolerância aos medicamentos afetaram seu uso clínico (HEZODE et al., 2014). Surgiram então os DAAs de segunda geração, que são caracterizados por elevadas taxas de RVS, bons perfis de segurança e tipos de administração mais confortáveis, entretanto a ocorrência de resistência viral já foi relatada (HEZODE et al., 2014; JIMENEZ-PEREZ et al., 2016).

O HCV é um vírus envelopado da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*. O genoma é constituído por uma fita simples de RNA, polaridade positiva, com uma única

região aberta de leitura (*open reading frame* – ORF) (GIANNINI; BRECHOT, 2003). O RNA viral codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3 mil aminoácidos, posteriormente clivada por proteases celulares e virais, originando proteínas estruturais (core, E1, E2 e p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). Nas extremidades do genoma estão localizadas regiões conservadas e não traduzíveis 5'UTR e 3'UTR (*untranslated region* - UTR) (BARTENSCHLAGER; FRESE; PIETSCHMANN, 2004; MORADPOUR et al., 2001), necessárias tanto para a tradução da poliproteína quanto para a replicação do vírus (BARTENSCHLAGER et al., 2004).

Muitas proteínas celulares interagem diretamente com proteínas virais ou são indiretamente necessárias ao processo de replicação do HCV (TAI et al., 2009). Um grupo de proteínas importantes para a replicação do vírus são as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP), uma vez que os vírus não as possuem e dependem de HSPs do hospedeiro para o dobramento adequado das proteínas virais (HOOPER; HIGHTOWER; HOOPER, 2012).

As HSPs são chaperonas e uma de suas funções é auxiliar o dobramento e manutenção de outras proteínas celulares e usualmente são sintetizadas em resposta ao estresse celular, podendo também ser expressas constitutivamente (PANARETOU et al., 1998). Existem diferentes tipos de estresses celulares como o choque térmico, a toxicidade a metais, a privação de nutrientes, bem como diversos estados patológicos, como o câncer e as infecções virais (GETHING, 1996; WU; TANGUAY, 2006). As proteínas de choque térmico são agrupadas em famílias, de acordo com sua massa molecular. As principais famílias são HSP110 e HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e a família das pequenas proteínas de choque térmico, conhecidas como HSPB e que possuem de 15-43 kDa (MYMRIKOV; SEIT-NEBI; GUSEV, 2011).

Os vírus que promovem quadros de infecções crônicas podem alterar a expressão de algumas HSPs de forma a garantir a persistência da infecção viral (GELLER; TAGUWA; FRYDMAN, 2012). Em infecções pelo HCV já foi demonstrado que a expressão de HSPA5 (MCPHERSON et al., 2011) e HSP70 (SEJIMA et al., 2012) encontra-se reduzida em presença do vírus. Entretanto, a proteína HSP27 apresenta efeito contrário, encontrando-se mais expressa em células contendo replicon subgenômico do vírus da hepatite C (FANG et al., 2006), além de apresentar interações com a proteína NS5A do HCV (CHOI et al., 2004).

O aumento ou redução na expressão de determinadas proteínas de choque térmico pode levar à queda da replicação do vírus da hepatite C. Estudos utilizando um inibidor de HSP90, a Geldanamicina, observaram redução da replicação do HCV

(NAKAGAWA et al., 2007; SHAN et al., 2011). Em contrapartida, a utilização da droga Bicyclol, que aumenta a expressão das proteínas HSP70 e HSP27, também levou à inibição do vírus (BAO; LIU, 2008; LIU, 2009).

Além de sua participação nas infecções virais, algumas proteínas de choque térmico auxiliam no dobramento de diversas proteínas celulares responsáveis pela regulação do ciclo celular. Com isso, alterações nessas HSPs podem causar indiretamente alterações nos ciclos, podendo estar relacionadas com processos tumorais (CIOCCA; CALDERWOOD, 2005; HAYASHI et al., 2005). Estudos demonstraram que proteínas de choque térmico como HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, HSPA5 e HSP90B1 são mais expressas em hepatocarcinoma, uma das mais graves consequências da infecção pelo HCV (LIM et al., 2005; LUK et al., 2006; TAKASHIMA et al., 2003).

Estes dados demonstram que as proteínas de choque térmico desempenham papéis importantes no ciclo celular e que a infecção pelo vírus da hepatite C pode alterar a expressão das HSPs e acarretar diversos danos à célula. Com isso, comparar os níveis de expressão das HSPs na presença e ausência do HCV é o primeiro passo para melhor compreender mecanismos virais que levam a essas alterações, além de possibilitarem alternativas mais eficazes no tratamento da hepatite C.

## 2 Levantamento Bibliográfico

### 2.1 Histórico

O vírus da hepatite C foi identificado a partir de um isolado de um paciente no fim da década de 80, por CHOO et al. (1989). Nesse período a ciência já havia identificado os causadores da Hepatite A (o vírus *hepatitis A virus* - HAV) e da Hepatite B (o vírus *hepatitis B virus* - HBV), entretanto algum agente desconhecido permanecia acometendo pacientes pós-transfusionais, causando uma doença similar aos vírus A e B (CHOO et al., 1989).

Devido ao desconhecimento do agente etiológico, na época, a doença foi designada como “hepatite não-a-não-b (NANB)” e esse termo foi utilizado até 1989, quando o vírus foi finalmente identificado a partir do cDNA de um paciente. A partir dessa data estabeleceu-se o termo até hoje conhecido, vírus da hepatite C (ALTER, H. J.; HOUGHTON, 2000; CHOO et al., 1989).

### 2.2 Vias de transmissão

A transmissão do vírus da hepatite C ocorre pelo contato com sangue de pacientes infectados. Acredita-se que a grande maioria dos portadores do HCV adquiriu o vírus por meio de transfusões sanguíneas, uma vez que o vírus foi descoberto apenas em 1989 e na época os bancos de sangue não conseguiam realizar triagens para esse vírus (BUSCH et al., 2005).

Com a adoção de exames rigorosos aos doadores de sangue a transmissão por essa via caiu a níveis praticamente nulos. Entretanto o HCV continuou se disseminando e atualmente a principal via de transmissão ocorre entre usuários de drogas, pelo compartilhamento de seringas contaminadas. Além disso, o HCV também pode ser transmitido com a prática de *piercing*, tatuagens, exposição ocupacional e hemodiálise, além do RNA viral já ter sido detectado em agulhas de acupuntura (ALTER, M. J., 2011; LEMOS et al., 2014). A transmissão vertical (da mãe para o feto) pode ocorrer e dependerá principalmente da carga viral da paciente e se há ocorrência de coinfecção por HIV, o que aumenta em até cinco vezes a taxa de transmissão para o bebê (CLARKE; KULASEGARAM, 2006). A via sexual ainda é muito discutida na comunidade científica,

mas o que se observa é que esta via é possivelmente menos eficiente para o vírus da hepatite C que para outros vírus como o HBV e o HIV (TERRAULT, 2002; TOHME; HOLMBERG, 2012).

Outra importante via de transmissão que ainda tem sido relatada é a realização de procedimentos médico-hospitalares sem esterilização adequada de materiais. Apesar de ter havido uma redução de 83% nos casos de infecções por HCV devido a seringas não esterilizadas, entre os anos de 2000 e 2010, há estimativas de que essa via ainda representam de 157.000 a 315.000 infecções por HCV anualmente (PEPIN et al., 2014). Outro fato alarmante foi relatado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que publicou em sua base de dados que em 2011 39 países não realizaram triagem viral rotineira para transfusões de sangue (LANINI et al., 2016).

Apesar da transmissão do HCV ser bastante estudada, em uma grande parcela dos portadores (aproximadamente 40%) não é possível fazer uma correlação direta com uma possível via de transmissão e esses fatores de risco ainda são desconhecidos (INDOLFI; NESI; RESTI, 2013; SHEPARD; FINELLI; ALTER, 2005).

## **2.3 Epidemiologia**

### **2.3.1 Prevalência global**

A hepatite C é uma doença de grande preocupação na saúde pública mundial, entretanto sua epidemiologia é de difícil acesso uma vez que a doença permanece assintomática durante anos. Uma revisão baseada em quase cinco mil estudos de 87 países gerou uma estimativa de que a prevalência do HCV está em torno 115 milhões de casos no mundo todo (GOWER et al., 2014; LANINI et al., 2016). Anualmente, de três a quatro milhões de novos casos são diagnosticados e a doença é endêmica em muitos em países (BUTT, 2005; KOZIEL; PETERS, 2007; SORIANO; PETERS; ZEUZEM, 2009). Porém, devido ao seu quadro assintomático, é difícil estimar o número real de pacientes infectados e acredita-se que a quantidade de indivíduos portadores do HCV possa ser significativamente maior (THRIFT et al., 2017).

A prevalência de hepatite C crônica é geralmente inferior a 2% (GOWER et al., 2014; MOHD HANAFIAH et al., 2013). A infecção pelo HCV é altamente prevalente na Ásia Central, Ásia Oriental e África do Norte - Oriente Médio, afetando 3,5% da população

de cada região. Sudeste Asiático, Andino, Centro e Sul da América Latina, Australásia, Caribe, Oceania, Europa e África subsaariana são regiões com prevalência moderada (1,5-3,5%), apesar da soro prevalência do HCV ser menor que 1% em vários países da Europa Ocidental (Reino Unido, Dinamarca, França, Alemanha, Suécia e Suíça). Ásia-Pacífico, América Latina tropical e América do Norte são as regiões com menor prevalência de HCV (menor que 1,5%) (MOHD HANAFIAH et al., 2013; THRIFT et al., 2017).

Dentro de um mesmo país é possível encontrar disparidade nesses valores, devido às condições socioeconômicas discrepantes que influenciam o tamanho e a prevalência da infecção em populações de maior risco, como usuários de drogas e o acesso à prevenção, diagnóstico e tratamento (LANINI et al., 2016).

Os dados escassos sobre a epidemiologia do HCV, considerando o número real de pacientes infectados, são um problema no Brasil e na maioria dos países latino-americanos (CASTRO et al., 2015). A notificação obrigatória de hepatite C começou em 1996 no Brasil: foram notificados 82.041 casos de HCV, 60,1% em homens e 39,9% em pacientes do sexo feminino de 1999 a 2011 (BRASIL, 2012). Incluindo os casos registrados de 2012 a 2015, mais de 150.000 pacientes confirmados com HCV foram identificados pelo sistema de vigilância brasileiro (BRASIL, 2015). Além disso estudos demonstraram uma prevalência do vírus de 0,62% na região Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul (ANDRADE et al., 2006; PALTANIN; REICHE, 2002).

### **2.3.2 Prevalência relacionada à idade e sexo**

Os padrões de prevalência em todas as faixas etárias são semelhantes em todas as regiões do mundo, com poucas exceções (MOHD HANAFIAH et al., 2013). Em geral, a prevalência é maior com o aumento da idade até atingir um pico em indivíduos com 55-64 anos, na maioria das regiões. No entanto, na África subsaariana ocidental, a curva de prevalência tem um pico anterior, aos 15-19 anos. Da mesma forma, na Australásia a prevalência primeiro atinge números elevados entre 20 e 24 anos e, posteriormente, entre 55 e 64 anos (BRUGGMANN et al., 2014; THRIFT et al., 2017).

Na maioria dos países com dados disponíveis, a prevalência de HCV é maior em homens do que em mulheres. Este dado reflete o maior número de fatores de risco, como o uso de drogas intravenosas, em homens do que em mulheres. Na França, no entanto, mais mulheres estão infectadas do que homens (BRUGGMANN et al., 2014). Da mesma forma, na Alemanha, mulheres com idade acima de 69 anos têm infecção por HCV acima do que

homens de mesma idade. Em ambos os países, as mulheres foram infectadas durante o parto no final da década de 1970 através do contato com sangue ou equipamentos contaminados (BRUGGMANN et al., 2014).

### **2.3.3 Prevalência genotípica do HCV**

Analisando-se as sequências de nucleotídeos no genoma do HCV é possível observar variações que permitem diferenciá-los em genótipos. Existem pelo menos seis genótipos conhecidos do HCV (nomeados de 1 a 6), que diferem em 30-35% de nucleotídeos. Mais recentemente foi reportado um sétimo genótipo, mas esta variante só foi encontrada em alguns indivíduos na África (KUIKEN; SIMMONDS, 2009; MURPHY et al., 2015).

As regiões virais com maior variabilidade na sequência nucleotídica ocorre nos genes que codificam as proteínas do envelope, como E1 e E2. A região de menor variabilidade no genoma do HCV entre os genótipos é encontrada na região 5'UTR (DI BISCEGLIE; HOOFNAGLE, 2002). Existem vários subtipos dentro de cada genótipo, identificados por letras minúsculas (a, b, c etc), que diferem entre si em 20-25% na sequência de nucleotídeos (PAWLOTSKY, 2003; SIMMONDS, 2004).

Os regimes de tratamento, sua duração e as taxas de cura, bem como o curso clínico, variam substancialmente entre os genótipos do HCV. Assim, a política de tratamento global depende da compreensão da prevalência de diferentes genótipos em diferentes regiões do mundo. O genótipo 1 do HCV é o genótipo mais prevalente no mundo, com 83,4 milhões de casos (46,2% de todos os casos de HCV). Os subtipos de HCV 1a e 1b são os mais comuns nos EUA e na Europa, enquanto que no Japão 73% das pessoas infectadas com HCV possuem o subtipo 1b (THRIFT et al., 2017). O genótipo 3 é o próximo genótipo mais prevalente, com 54,3 milhões de casos (30,1%) em todo o mundo. A alta prevalência do genótipo 3 do HCV é um problema porque, em comparação com outros genótipos, esse genótipo representa um risco aumentado de complicações hepáticas graves e de mortalidade geral em todos os pacientes infectados com o vírus (KANWAL et al., 2014).

Os genótipos 2, 4 e 6 representam 22,8% dos casos de HCV e o genótipo 5 contribui com menos de 1%. Existe grande variação na distribuição de diferentes genótipos de HCV: o genótipo 1 é o tipo predominante em 85 dos 117 países; O genótipo 3 é comum no sul da Ásia e relativamente raro na África; A frequência do genótipo 4 é a mais alta da África Central ao Oriente Médio; O genótipo 5 prevalece apenas no sul da África; O genótipo 6 também é relativamente restrito em sua extensão geográfica, com maior frequência no Leste e



## **2.4 Patologia**

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

### **2.4.1 Infecção aguda pelo HCV**

A fase aguda é frequentemente assintomática na maioria dos infectados e a evolução para a cronicidade ocorre em aproximadamente 80% dos casos (ALTER, H. J.; HOUGHTON, 2000). Quando presentes, os sintomas geralmente são fadiga, mialgia, febre baixa e náusea/vômito (MAHESHWARI; RAY; THULUVATH, 2008). Os quadros de hepatite aguda podem ser graves e prolongados, podendo se manifestar de 2 a 12 semanas após a exposição inicial, mas raramente evoluem para quadros fulminantes (GERLACH et al., 2003).

Os indivíduos assintomáticos são mais difíceis de serem identificados, mas estudos disponíveis apontam que 15-40% dos indivíduos resolvem sua doença naturalmente (cura espontânea). Fatores como a resposta imune (determinada pela genética do hospedeiro), gênero, modo de infecção, gravidade da doença aguda, presença de icterícia, imunossupressão via corticosteróides, coinfeção com HIV, são todos determinantes da resposta aguda à infecção e a possível cura do paciente (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

### **2.4.2 Infecção crônica pelo HCV**

A infecção crônica, como mencionado acima, afeta a maioria dos infectados (aproximadamente 80%) e é caracterizada pela detecção do RNA do HCV seis meses após a provável data da infecção. Assim como na fase aguda, inicialmente os pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomas muito inespecíficos como letargia, dores musculares e articulares, cansaço, náuseas e síndrome gripal (MAHESHWARI et al., 2008; RUSTGI, 2007).

Aproximadamente 20% dos pacientes crônicos desenvolvem lesões leves no fígado. Os demais evoluem para fibrose grave e/ou cirrose em até 10 anos e dentre esses, em

30 a 50%, o quadro clínico pode progredir para o Hepatocarcinoma (HCC) (GIANNINI; BRECHOT, 2003).

A duração da infecção pelo HCV, o gênero, o envelhecimento e os polimorfismos genéticos são fatores de risco importantes para fibrose e cirrose severas (THEIN et al., 2008), sendo a taxa de progressão em um paciente de 50 anos quase três vezes maior que em um paciente de 20 anos de idade (RYDER et al., 2004). A idade no momento da infecção também é importante, com menores taxas de progressão naquelas pessoas infectadas durante a infância do que as infectadas durante a idade adulta (PRADAT et al., 2007).

Vários fatores influenciam o risco de HCC em pacientes com cirrose relacionada ao HCV. Geralmente, o risco de HCC é aumentado em pacientes com idade superior a 50 anos ou quando infectados acima dessa idade, pacientes com longa duração de infecção, homens, sobrepeso, *diabetes mellitus* e pacientes com cirrose avançada ou níveis elevados de  $\alpha$ -fetoproteína (THRIFT et al., 2017). A infecção pelo genótipo 1 do HCV pode aumentar o risco de cirrose e HCC em comparação com os outros genótipos do HCV. A infecção pelo genótipo 3 foi associada à rápida progressão da fibrose em uma meta-análise de estudos com biópsias (PROBST et al., 2011; RAIMONDI et al., 2009).

Além disso o vírus da hepatite C aumenta o risco de hepatocarcinoma por promover um quadro de inflamação e fibrose do fígado, que eventualmente resulta em cirrose hepática (YAMASHITA; HONDA; KANEKO, 2011). O fígado é composto principalmente por hepatócitos e também por células estreladas, que encontram-se mais ativas em presença do vírus. Essas células são responsáveis pela produção de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, causando fibrose nos quadros de infecção. A longo prazo o acúmulo de alterações pode levar ao surgimento da cirrose e posterior progressão para HCC (ASSELAH; BENHAMOU; MARCELLIN, 2009; MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002).

Além disso, evidências experimentais indicam a contribuição direta do HCV na malignização dos hepatócitos e que diferentes proteínas virais estão sendo relacionadas ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (LEVRERO, 2006). Este potencial está relacionado com a interferência das proteínas do HCV com proteínas celulares que podem atuar no controle do ciclo celular (NGUYEN et al., 2003; SELIMOVIC et al., 2012).

## 2.5 Tratamento

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

O Interferon (IFN) ou o IFN peguilado (PEG-IFN) em combinação com ribavirina (RBV) foram os principais agentes farmacológicos para o tratamento de infecção por HCV. O IFN é uma citocina que compõe a resposta imune inata do hospedeiro e a adição de uma molécula de polietilenoglicol à molécula do IFN (PEG-IFN) prolonga a ação, eleva a velocidade de absorção e aumenta a meia-vida do IFN. A RBV é um antiviral análogo de nucleosídeo utilizado por via oral (FARNIK et al., 2010). No entanto, apenas 30-40% dos indivíduos com o genótipo 1 e 70-90% daqueles com genótipo 2 e 3 tratados com PEG-IFN em associação com RBV foram capazes de alcançar uma resposta virológica sustentada (RVS) (FRIED et al., 2002).

Em 2011, a associação dos antivirais de ação direta de primeira geração (*Direct-acting antivirals* - DAAs), boceprevir e telaprevir, com PEG-IFN e RBV aumentou as taxas gerais de RVS para 68-75% para pacientes não tratados previamente e para 59-88% para pacientes já tratados, mesmo que estes regimes fossem dedicados apenas aos pacientes portadores do genótipo 1 (BACON et al., 2011). No entanto, a longa duração do tratamento (24 a 48 semanas) e a escassa tolerabilidade do boceprevir e do telaprevir, especialmente por pacientes cirróticos, afetaram fortemente seu uso clínico e levaram à busca de novos medicamentos (HEZODE et al., 2014).

Surgiram então os DAAs de segunda geração, que são caracterizados por elevadas taxas de RVS, bons perfis de segurança e tipos de administração mais confortáveis. Eles podem ser usados ou não em combinação com RBV, dependendo de características virológicas e associadas à doença. Sofosbuvir (SOF) foi o primeiro novo agente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em dezembro de 2013 (PONZIANI et al., 2017).

O Sofosbuvir atua na replicação do RNA viral com uma eficácia pangenotípica, uma vez que bloqueia a polimerase NS5B, que está altamente preservada entre os diferentes genótipos de HCV (SOFIA et al., 2010). O tratamento com essa droga, em

combinação com PEG-IFN e RBV ou com ribavirina sozinha, mostrou taxas de resposta virológica sustentada acima de 85%, 12 semanas após o término do tratamento (RVS12) (LAWITZ et al., 2013).

Foram então aprovados sucessivamente novos DAAs para o tratamento da infecção por HCV em associação com Sofosbuvir: Simeprevir (SMV, um inibidor de protease NS3/4A) e Ledipasvir (LDV, um inibidor de NS5A) para o genótipo 1; Daclatasvir (DCV, um inibidor de NS5A ) para o genótipo 3, relatando taxas de RVS12 superiores a 90% (AFDHAL et al., 2014; LAWITZ et al., 2013; SULKOWSKI et al., 2014). Mais recentemente, o inibidor pangenotípico Velpatasvir, inibidor de NS5A, também foi aprovado para tratamento de HCV em combinação com Sofosbuvir (FOSTER et al., 2015).

A principal vantagem dos novos regimes antivirais baseados em DAA é a obtenção de altas taxas de RVS para todos os genótipos de HCV dentro de um curto período de tratamento, juntamente com a ocorrência pouco frequente de efeitos colaterais, geralmente de grau leve. Entretanto existem variantes virais que estão associadas à resistência às drogas e que podem existir antes mesmo do início ao tratamento. Essas variantes podem persistir por anos após o uso dos medicamentos e estão associadas a falhas no tratamento, que podem ocorrer em cerca de 10% a 15% dos pacientes (JIMENEZ-PEREZ et al., 2016). Além disso, assim como no tratamento clássico, os novos fármacos podem trazer efeitos colaterais e estão sendo reportados casos de piora na falência hepática e agravamento da função renal, principalmente nos pacientes pré-cirróticos (BUTT et al., 2016).

## 2.6 O vírus da Hepatite C

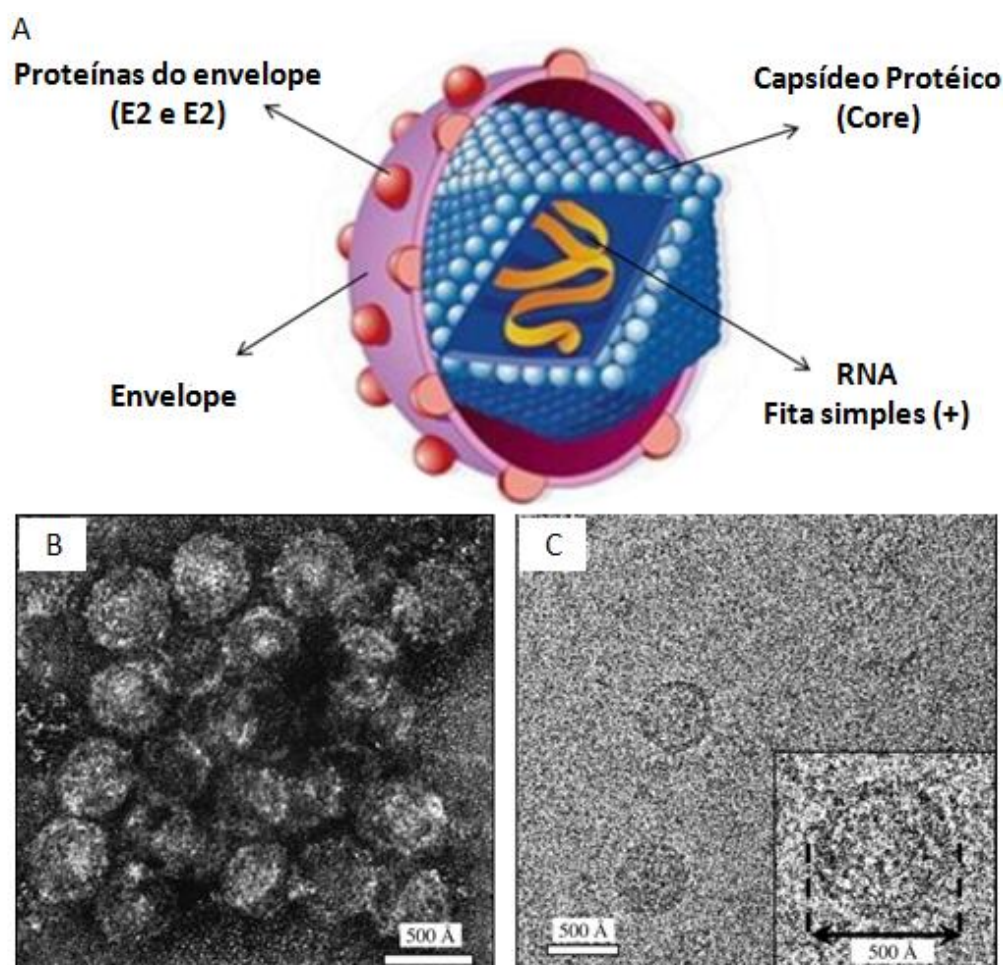
### 2.6.1 Filogenia do vírus

O HCV é um vírus da família *Flaviviridae*, que inclui outros patógenos humanos como dengue, vírus do Nilo Ocidental e Febre Amarela. A família *Flaviviridae* é composta por três gêneros: os *Pestivirus* (causadores de infecções em bovinos), os *Flavivirus* (onde encontram-se o vírus da Febre Amarela e o Zika vírus) e por fim os *Hepacivirus* (onde o HCV está agrupado) (MOUREAU et al., 2015).

### 2.6.2 Morfologia

A partícula viral apresenta aproximadamente 50 nm de diâmetro e é formada por um envelope lipídico derivado das membranas do hospedeiro, onde estão inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2. O material genético viral está associado com a proteína do capsídeo (Core) para formar o nucleocapsídeo, que mede cerca de 30 nm de diâmetro (Figura 2) (KAITO et al., 1994).

Figura 2: Morfologia do vírus da hepatite C. A: esquema tridimensional evidenciando a morfologia e organização estrutural do HCV. B: imagens de microscopia eletrônica de transmissão do HCV isolado de cultura celular (JFH-1). C: imagens CryoEM de virions do HCV incorporados em gelo vítreo.



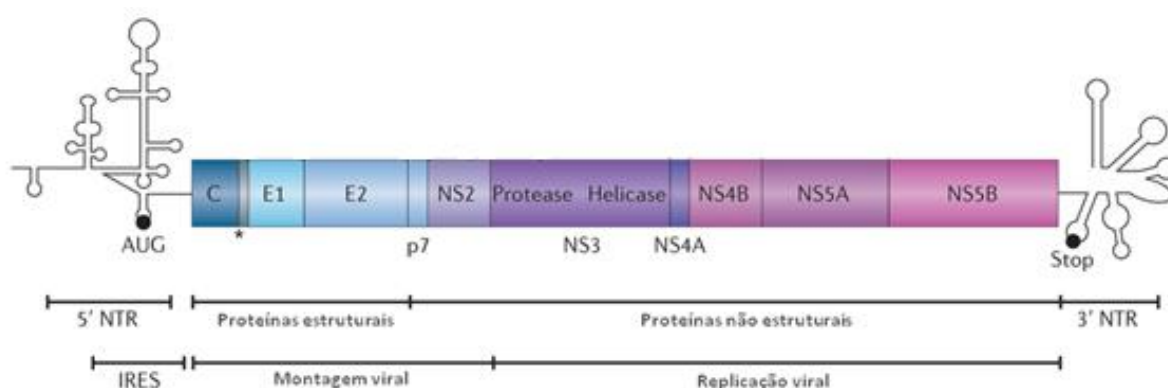
Fonte: adaptado de Perkins, 2001 e Yu, 2007.

### 2.6.3 Material genético

O genoma de aproximadamente 9.6 kb é constituído por uma fita simples de RNA, polaridade positiva, com uma única região aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) (FERREIRA et al., 2004). O RNA viral codifica uma poliproteína precursora de

aproximadamente 3.000 aminoácidos que posteriormente é co e pós-traducionalmente processada por proteases virais e celulares originando dez proteínas: estruturais (C, E1, E2 e p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) que estão associadas às membranas intracelulares. Nas extremidades do genoma estão localizadas regiões conservadas e não traduzidas 5' e 3'UTR (*untranslated region* – UTR) (BARTENSCHLAGER et al., 2004; MORADPOUR et al., 2001) necessárias tanto para a tradução da proteína quanto para a replicação do vírus (Figura 3) (DOUAM; PLOSS, 2015; FRIEBE; BARTENSCHLAGER, 2002).

Figura 3: Esquema da organização do genoma do HCV.



Fonte: adaptado de BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013 .

## 2.6.4 Funções das proteínas e regiões virais

### 2.6.4.1 Regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR

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

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

#### **2.6.4.2 Proteína do Core**

A primeira proteína estrutural é a proteína do core, composta pelos primeiros 191 aminoácidos, é a segunda região mais conservada do genoma viral, constituindo o seu nucleocapsídeo. A associação do core com gotículas de lipídeo (*lipid droplets-LD*) e a interação com NS5A desempenham papéis centrais na montagem dos nucleocapsídeos (BOULANT; TARGETT-ADAMS; MCLAUCHLAN, 2007; MASAKI et al., 2008; MORADPOUR; PENIN, 2013).

Geralmente é encontrada no citoplasma, onde está ligada ao retículo endoplasmático, ou pode estar localizada no núcleo em menor proporção. Além disso, a proteína do core pode estar envolvida na modulação da transcrição de genes, proliferação celular, apoptose e sinalização celular, podendo interferir no metabolismo de lipídeos e na supressão da resposta imune (GIANNINI; BRECHOT, 2003; PENIN et al., 2004).

#### **2.6.4.3 Glicoproteínas E1 e E2**

As glicoproteínas de envelope E1 e E2 desempenham papéis fundamentais em diferentes etapas do ciclo de vida do HCV, incluindo a montagem da partícula infecciosa, entrada de vírus e fusão com a membrana endossomal. Para cumprir essas funções, E1 e E2 provavelmente adotam conformações marcadamente diferentes que devem ser rigorosamente controladas para ocorrer no momento apropriado durante o ciclo de vida viral (MORADPOUR; PENIN, 2013).

As proteínas E1 e E2 possuem regiões muito variáveis e estão altamente glicosiladas. Apresentam um importante papel na entrada do vírus na célula devido à ligação destas proteínas com receptores celulares, como o CD81 e SR-B1 (SCARSELLI et al., 2002).

#### **2.6.4.4 Proteína p7**

A p7 é um polipeptídeo integral de membrana com 63 aminoácidos. Formam hexâmeros ou heptâmeros com atividade de canais catiônicos e facilita a produção de vírus, pertencendo à família das viroporinas (CHANDLER et al., 2012; STEINMANN et al.,

2007). A proteína p7 não é necessária para as etapas de replicação do RNA viral *in vitro*, mas é essencial para a montagem e liberação de HCV infeccioso, tanto em modelos *in vitro* quanto em infecção produtiva *in vivo* (MORADPOUR; PENIN, 2013).

#### **2.6.4.5 Proteína NS2**

A primeira proteína não estrutural é a proteína NS2, apresentando 217 aminoácidos. Essa proteína aparece associada com a NS3, formando a autoprotease NS2/NS3, e é responsável pela maturação das outras proteínas NS (LINDENBACH; RICE, 2005). A própria protease NS2 é dispensável para a replicação do RNA, mas a clivagem de NS2/NS3 é essencial para liberar a proteína NS3 totalmente funcional e, portanto, promover a replicação do RNA viral. (KOLYKHALOV et al., 2000; PIETSCHMANN et al., 2006). A NS2 desempenha importante papel de organização na montagem de partículas virais infecciosas do HCV. Essa função é independente da sua atividade de protease e pode envolver uma rede complexa de interações com proteínas virais estruturais e não estruturais como E1 (mediada por E2), E2, p7, NS3, NS5A (BOSON et al., 2011; JIRASKO et al., 2010; STAPLEFORD; LINDENBACH, 2011).

#### **2.6.4.6 Proteína NS3**

A NS3 é uma proteína multifuncional de aproximadamente 70 kDa, constituída de um domínio N-terminal serino protease e um domínio C-terminal RNA helicase/NTPase. A serino protease e o cofator NS4A estabilizam e ativam a função protease para clivar os sítios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (LINDENBACH; RICE, 2005). A helicase NS3 é essencial para a replicação do HCV e também participa da montagem da partícula viral (MURRAY; JONES; RICE, 2008). No entanto, as funções precisas no ciclo de vida viral ainda não estão bem elucidadas (MORADPOUR; PENIN, 2013).

#### **2.6.4.7 Proteína NS4A**

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

O complexo NS3-4A está localizado nas membranas do retículo endoplasmático, nos complexos de replicação e também, em menor grau, nas membranas associadas à mitocôndria. Acredita-se que essa associação esteja relacionada à evasão do sistema imune inato, por atuar sobre importantes proteínas celulares como a MAVS (HORNER et al., 2011; MEYLAN et al., 2005).

#### **2.6.4.8 Proteína NS4B**

A proteína NS4B é pouco caracterizada (MORADPOUR; PENIN, 2013). Trata-se de uma pequena proteína hidrofóbica que participa de um importante papel no recrutamento de outras proteínas virais. A NS4B interage diretamente com a proteína NS4A e indiretamente com NS3 e NS5A (LIN et al., 1997). Estudos demonstraram que a NS4B está envolvida na produção de uma estrutura de membrana citoplasmática (“*membranous web*”) que forma o complexo de replicação viral (EGGER et al., 2002).

NS4B interage com outras proteínas virais não-estruturais e foi relatado que ela pode se ligar ao RNA viral. Além disso, estudos demonstraram que essa proteína possui também atividade NTPase, e que desempenha papel na montagem viral (EINAV et al., 2004; JONES et al., 2009).

#### **2.6.4.9 Proteína NS5A**

A proteína não estrutural NS5A é uma fosfoproteína ancorada na membrana do retículo endoplasmático que possui várias funções na patogênese, replicação viral e resistência ao interferon e outras drogas (MACDONALD; HARRIS, 2004; MORADPOUR; PENIN, 2013; REED; XU; RICE, 1997).

Análises bioquímicas e genéticas das interações proteína-proteína demonstraram que a NS5A é capaz de interagir independentemente com todas as proteínas não-estruturais, incluindo a interação NS5A-NS5A. Estes dados em concordância com a necessidade da presença de outra proteína não estrutural para a realização da hiperfosforilação da NS5A indicam a participação desta proteína no complexo de replicação multiprotéico (DIMITROVA et al., 2003).

#### **2.6.4.10 Proteína NS5B**

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

A replicação de HCV ocorre pela síntese de um RNA de polaridade negativa complementar utilizando o genoma como molde e a subsequente síntese de RNA de polaridade positiva a partir deste modelo de RNA negativo. A principal enzima responsável por ambas as etapas é a NS5B RdRp (RNA polimerase RNA dependente) (BEHRENS; TOMEI; DE FRANCESCO, 1996; MORADPOUR; PENIN, 2013).

### **2.6.5 Replicação viral**

A estratégia de replicação do HCV é parecida com a de outros vírus de RNA de polaridade positiva. O ciclo de replicação se inicia com a entrada do vírus em sua célula alvo principal, o hepatócito. A entrada do vírus é um processo altamente complexo e com diversas etapas iniciando-se pela ligação das glicoproteínas do envelope E1 e E2 com diferentes proteínas/receptores presentes na superfície da célula (por exemplo, heparan sulfato e receptores de proteínas de baixa densidade) ou ainda que contribuem para a entrada do vírus (CD81, ocludina, claudina) (BUHLER; BARTENSCHLAGER, 2012; ZEISEL et al., 2011). Após a ligação, a entrada de HCV nas células ocorre por endocitose mediada por clatrina, seguida da fusão entre as membranas viral e endossomal, o que leva à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Acredita-se que a glicoproteína do envelope E1 seja a glicoproteína que facilita a fusão celular (BLANCHARD et al., 2006; MANNS et al., 2017).

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

O restante do genoma codifica as proteínas não estruturais (NS) que são responsáveis pelo processo de replicação do HCV. Estas proteínas se associam do lado

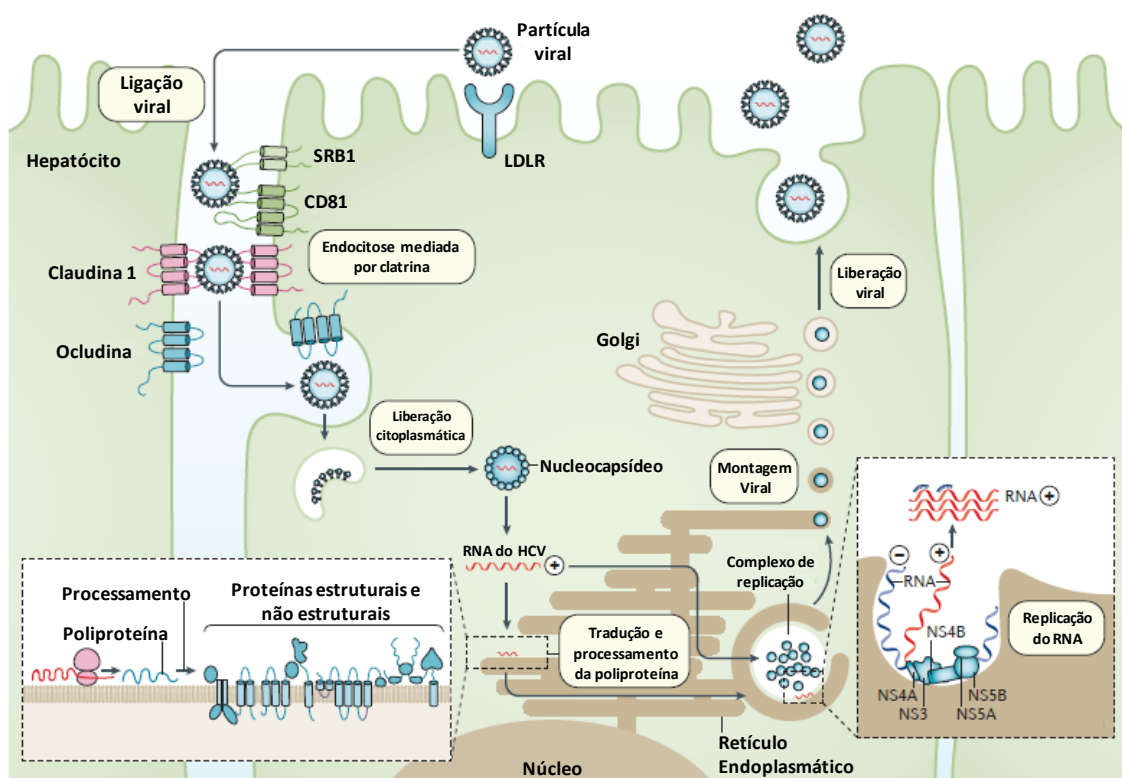
citoplasmático da membrana do RE, onde interagem entre si e com as proteínas do hospedeiro para formar a maquinaria de replicação viral. Essa maquinaria usa seu próprio genoma (polaridade positiva) como molde para a síntese de um intermediário de replicação de cadeia negativa. Então, os RNAs de cadeia negativa servem como modelos para produzir numerosas fitas de polaridade positiva que são posteriormente utilizados para a tradução de poliproteínas, para a síntese de novos intermediários de replicação ou então são empacotada para constituir novos vírions (Figura 4) (DE FRANCESCO et al., 2003; LOHMANN, 2013; MORADPOUR et al., 2007).

As proteínas de replicação do HCV, presumivelmente em conjunto com os fatores das células hospedeiras, induzem rearranjos maciços de membranas intracelulares, incluindo a formação de vesículas de membrana dupla (FERRARIS; BLANCHARD; ROINGEARD, 2010; ROMERO-BREY et al., 2012). Essas estruturas membranosas se manifestam como conjuntos de vesículas que são designados como redes membranosas ("*membranous web*") que suportam e compartimentam a replicação do HCV (BARTENSCHLAGER et al., 2013; GOSERT et al., 2003).

A replicação é realizada pela proteína NS5B. A proteína NS5A e o domínio helicase-NTPase da proteína NS3 desempenham uma importante parte reguladora na replicação. O domínio I e o domínio II da proteína NS5A são necessários para a replicação do HCV no complexo de replicação. O estado de fosforilação de NS5A modula o equilíbrio entre replicação e fases posteriores do ciclo de vida do HCV. A helicase NS3 tem um papel importante na separação de fitas de RNA nascentes da fita molde, desencadeando estruturas secundárias de RNA (SCHEEL; RICE, 2013).

A formação de partículas virais é iniciada pela interação das proteínas do Core e NS5A com RNA genômico em gotículas lipídicas citoplasmáticas. O HCV usa a via de produção de proteínas de baixa densidade (*very-low-density lipoproteins* - *VLDL*) nas etapas finais de montagem e liberação das partículas virais (LINDENBACH, 2013).

Figura 4: Esquema do ciclo de replicação do HCV em células hepáticas.



Fonte: adaptado de MANNS et al., 2017 .

## 2.7 Ferramentas para o estudo do HCV

Desde a descoberta do HCV os pesquisadores ficaram limitados em suas pesquisas devido à ausência de modelos adequados que fossem capazes de sustentar e simular o ciclo de vida do vírus. O único modelo animal capaz de cumprir essa função é o chimpanzé e sua utilização foi fundamental para estudos de patogênese e imunidade ao HCV (BUKH, 2012). Subsequentemente, foram desenvolvidos modelos de camundongos quiméricamente humanos ou geneticamente modificados permissivos ao HCV. Nestes modelos, a infecção robusta com HCV só pode ser conseguida em ratos deficientes em células T e B com fígados quiméricos humanos, inviabilizando-se assim estudos de imunidade adaptativa. Ademais, modelos animais, além de apresentarem elevados custos para sua manutenção, atualmente enfrentam fortes pressões para que sua utilização seja reduzida (MERCER et al., 2001).

Outro grande obstáculo para a compreensão do ciclo de vida do HCV foi a falta de um sistema de cultura celular capaz de replicar o vírus eficientemente *in vitro*. Surgiram então os primeiros sistemas de replicons selecionáveis, que permitiram a

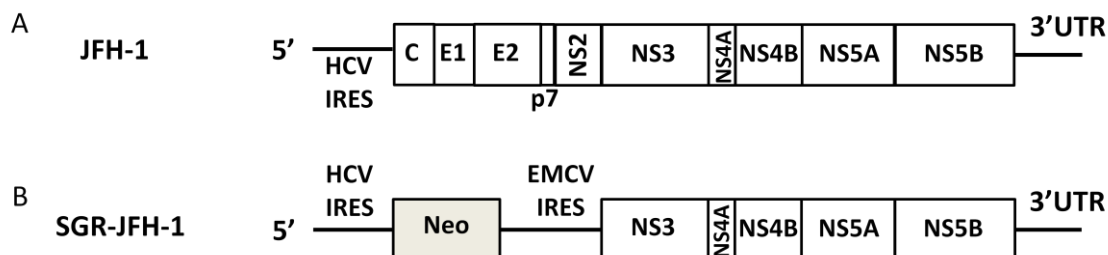
compreensão da replicação do HCV. Os modelos com pseudopartículas, baseadas em retrovírus, levaram a mais conhecimento sobre a entrada viral. Em 2005, sistemas completos de replicação viral permitiram a investigação de todo o ciclo de vida do vírus (DUBUISSON; COSSET, 2014). Esses importantes avanços científicos, particularmente o desenvolvimento do sistema de replicons, permitiram a exploração de formas de interromper o ciclo de vida do HCV e levaram a avaliação mais rápida de potenciais candidatos a fármacos (CARTER; CONNELLY; STRUBLE, 2016).

Os replicons para o HCV podem ser subgenômicos (contendo apenas as proteínas não estruturais para a replicação do RNA) ou genômicos (contendo o genoma completo do HCV), capazes de formar partículas infecciosas. Ambos podem conter o gene neomicina fosfotransferase (*neo*), para seleção ao antibiótico G418. Esse gene permite que células contendo os replicons sejam selecionadas via G418, estabelecendo-se linhagens estáveis expressando o modelo viral. Devido à sua elevada eficiência, os replicons tornaram-se aceitos como uma importante ferramenta para estudar os mecanismos moleculares da replicação do vírus da hepatite C (ALI ASHFAQ et al., 2011; BUHLER; BARTENSCHLAGER, 2012).

Wakita et al. (2005) desenvolveram um replicon genômico do HCV (conhecido por JFH-1), expressando o genoma completo do vírus, genótipo 2a, que foi isolado de um paciente japonês com Hepatite C fulminante. Este genoma replica eficientemente e produz partículas virais em células de hepatoma humano Huh7 (ALI ASHFAQ et al., 2011; WAKITA et al., 2005) (Figura 5A).

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

Figura 5: Esquema dos replicons para estudo do HCV. A: replicon genômico do HVC (JFH-1) apresentando proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. B: replicon subgenômico do HCV (SGR-JFH-1) apresentando as proteínas não-estruturais no vírus.



Fonte: o autor, 2017.

Além do genótipo 2a, outros modelos de replicons para os demais genótipos do HCV também foram estabelecidos. O replicon S52/SG-Feo expressa as proteínas não estruturais do HCV (de NS3 a NS5) para o genótipo 3, também contém o gene de resistência ao G418 e possui mutações adaptativas na região NS5A, que conferem maior taxa de replicação em cultura (SAEED et al., 2012).

## 2.8 Proteínas de choque térmico (HSP)

Diversas proteínas celulares são conhecidas por interagirem com o HCV ou por serem necessárias ao processo de replicação viral. Uma família importante dessas proteínas é a família das *heat shock proteins* (HSPs), ou proteínas de choque térmico, que geralmente são sintetizadas em resposta ao estresse celular, mas que também podem ser expressas constitutivamente em alguns casos. Existem diversos tipos de estresses que incluem choque térmico, variação do pH, toxicidade a metais, privação de nutrientes, bem como diversos estados patológicos como o câncer e infecções bacterianas ou virais (GETHING, 1996). Em condições normais sua função é auxiliar no dobramento e manutenção de diversas proteínas celulares (JEE, 2016; PANARETOU et al., 1998).

As chaperonas são abundantes nos ambientes celulares e por causa da sua multifuncionalidade podem ser usadas como biomarcadores para prognósticos confiáveis com fins terapêuticos, como ocorre em doenças neuromusculares ou estudos relacionados ao câncer. Além disso a diversidade funcional das HSPs fornece aos cientistas informações sobre mecanismos de proteção intracelular. Isso faz com que essas *heat shocks* possam ser

moléculas alvo para se investigar os mecanismos de defesa que ocorrem dentro das células (JEE, 2016).

As principais famílias de proteínas de choque térmico incluem HSP100 e HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP40, além da família das pequenas proteínas de choque térmico, conhecidas como HSPB ou sHSP (*small HSP*) (MYMRIKOV et al., 2011).

### **2.8.1 Pequenas proteínas de choque térmico**

A massa molecular das sHSP varia de 15 a 43 kDa, também chamadas de proteína de choque térmico  $\beta$  (HSPBs) e desempenham funções no processo de desenvolvimento embrionário. As HSPBs também interagem com proteínas do citoesqueleto para manter a homeostase dessas proteínas, evitando danos que resultariam na perda da função celular (JEE, 2016; JUO et al., 2016).

### **2.8.2 HSP40**

Apesar de pouco estudada, essa é a maior e mais diversificada família de co-chaperonas, também chamada de família de proteínas DNAJ. A família DNAJ em humanos atualmente é composta por 49 membros e é dividida em três subclasses: tipo I (DNAJA), tipo II (DNAJB) e tipo III (DNAJC) (CHEETHAM; CAPLAN, 1998; STERRENBURG; BLATCH; EDKINS, 2011).

DNAJs são amplamente conhecidas como reguladoras das funções de HSP70, mas também atuam em conjunto com a HSP90, além de um número crescente de funções biológicas que podem ser independentes de qualquer uma destas chaperonas (CHAPPLE et al., 2004; HERNANDEZ; CHADLI; TOFT, 2002). As proteínas DNAJ são diferencialmente expressas nos tecidos humanos e demonstram a capacidade de promover e suprimir o desenvolvimento de células cancerosas, atuando como chaperonas de supressores de tumor ou oncoproteínas (STERRENBURG et al., 2011).

### **2.8.3 HSP60**

A desregulação na expressão de proteínas da família HSP60 mostrou estar envolvida no desenvolvimento de muitas doenças como artrite em ratos, artrite reumatóide em humanos, *diabetes mellitus* dependente de insulina em camundongos e esclerose sistêmica

em humanos. Os membros dessa família estão localizados predominantemente nas mitocôndrias (JEE, 2016).

#### **2.8.4 HSP70**

As HSP70 estão presentes no citosol e abrigam a GRP78, que desempenha papel em ajudar o processo de dobramento de proteínas e redobrar, transportar e bloquear a degradação da proteína no retículo endoplasmático. Como uma chaperona, a HSP70 desempenha um papel na montagem e transporte de proteínas recentemente sintetizadas dentro das células, bem como na remoção de proteínas desnaturadas. Além disso, HSP70 atua para que proteínas maduras sejam dobradas para suas estruturas funcionais (JEE, 2016).

#### **2.8.5 HSP90**

A Hsp90 é uma das proteínas mais abundantes da célula dentro da classe das chaperonas – representando 1-2% das proteínas celulares quando a célula não se encontra sob estresses e 6% sob estresse celular. Em células de mamíferos existem duas isoformas da HSP90: HSP90 $\alpha$  e HSP90 $\beta$ , que são codificadas por genes diferentes onde a primeira é induzida e a segunda é expressa constitutivamente. Porém ambas as formas são fortemente relacionadas e parecem ter atividades idênticas (CHEN et al., 2005).

HSP90s estão localizadas no citoplasma e no retículo endoplasmático para desempenhar papéis no dobramento de proteínas recém-sintetizadas. Além disso HSP90 se liga a receptores de esteróides, filamentos intermediários, microtúbulos e microfilamentos de actina de uma maneira específica (JEE, 2016; WEGELE; MULLER; BUCHNER, 2004).

#### **2.8.6 HSP100 e HSP110**

A HSP100 está localizada no citoplasma e atua como cochaperona com HSP40, HSP70 e HSP90. Além disso desempenha um papel no redobramento de agregados proteicos (JEE, 2016).

Já o grupo das HSP110 está localizado no citosol e núcleo e uma de suas funções é atuar com HSP70 ou GRP78 para dobrar proteínas em momentos de estresse, promovendo a sobrevivência celular (GETHING; SAMBROOK, 1992).

### 2.8.7 HSPs e o HCV

Os vírus que causam infecções crônicas podem alterar a expressão de proteínas de choque térmico de forma a promover a persistência viral, ou então, como um mecanismo de defesa em que a célula pode aumentar ou diminuir a expressão dessas HSPs, na tentativa de eliminar a infecção (GELLER et al., 2012). Os vírus não possuem proteínas de choque térmico e dependem de HSPs do hospedeiro para o dobramento correto de proteínas virais (HOOPER et al., 2012). Diversos estudos têm evidenciado essa relação entre os vírus e as proteínas de choque térmico, como os relatados a seguir.

A expressão da proteína HSP70 é reduzida em infecções por HCV (SEJIMA et al., 2012) e a proteína HSP27 encontra-se mais expressa em células contendo um replicon subgenômico do HCV (FANG et al., 2006). Análises de biópsias hepáticas de pacientes com Hepatite C observaram uma redução nos níveis de HSPA5 (um membro da família da HSP70) e a perda dessa proteína foi relacionada com o aumento da carga viral (MCIPHERSON et al., 2011).

Estudos demonstraram que a HSP70 apresenta interação com a proteína viral E2 (PARENT et al., 2009) e Choi e colaboradores, em 2004, demonstraram a interação física entre HSP27 a proteína viral NS5A (CHOI et al., 2004). A proteína HSP90 é um fator importante no ciclo de vida do HCV e quando inibida promove redução da replicação viral (NAKAGAWA et al., 2007). Ela apresenta uma interação física com a protease viral NS2/3 (WAXMAN et al., 2001) que é responsável pela clivagem entre as proteínas NS2 e NS3 do HCV e, além disso, diferentes isoformas da HSP90 podem interagir com a proteína viral NS5A (CUI; FANG; HAN, 2012; GRAKOUÏ et al., 1993; SELBY et al., 1993).

Estudos *in silico* também demonstraram possíveis interações entre proteínas virais e algumas HSPs como HSPA1L, HSPA4 e HSP105, que podem estar relacionadas com as proteínas virais E1 e E2 (CUI et al., 2012).

Portanto, pode-se observar o importante papel desempenhado pelas proteínas de choque térmico durante as infecções virais. Com isso, identificar o perfil de alteração das HSPs que ocorre em presença do HCV é o primeiro passo para melhor compreender mecanismos virais que levam a diversas alterações celulares. Estes dados fornecem também uma estratégia de combate viral, uma vez que o restabelecimento da expressão das HSPs pode levar à diminuição da replicação viral.

### 3 Justificativa

A hepatite C pode levar à cirrose e ao hepatocarcinoma, sendo uma questão de saúde pública mundial. O tratamento atual é realizado com interferon, ribavirina e drogas de ação direta, porém a terapia apresenta elevado custo, efeitos colaterais e ocorrência de resistência viral.

Em virtude de diversas proteínas celulares interagirem e participarem do processo de replicação viral, esta tem sido uma importante abordagem no tratamento à hepatite C. Uma classe de proteínas candidatas a essa nova estratégia é a classe das proteínas de choque térmico (HSP). Diversas infecções virais alteram a expressão das HSPs a fim de facilitar e aumentar as taxas de replicação viral e diversos estudos têm demonstrado interações entre HSPs e proteínas do HCV. Além de ocorrer um aumento na produção de partículas virais, o painel de expressão das HSPs é alterado, trazendo diversas consequências ao paciente como quadros de dor e inflamação de órgãos.

A interferência do vírus da hepatite C na expressão das HSPs, de forma geral, ainda é pouco conhecida, bem como as consequências dessas interações para a célula. Por isso, estudos que busquem esclarecer essas interações são importantes e podem auxiliar na melhor compreensão do ciclo replicativo do vírus, e consequentemente fornecer novas abordagens terapêuticas.

Dessa maneira, conhecer as desregulações que ocorrem com as proteínas de choque térmico durante a infecção pelo HCV é de extrema importância. A partir da identificação das proteínas com expressão alterada é possível adotar estratégias de retomada da expressão destas HSPs a fim de investigar o comportamento viral nestes casos. Tal abordagem pode fornecer importantes ferramentas na compreensão do ciclo replicativo e no combate ao HCV.

## 4 Objetivos gerais

Avaliar, *in vitro*, a expressão gênica de proteínas de choque térmico (HSP) em células hepáticas na presença e ausência de infecção pelo vírus da hepatite C e identificar as HSPs que tenham seu perfil de expressão alterado para então avaliar seu papel na replicação viral.

### 4.1 Objetivos específicos

1. Avaliar *in vitro* o perfil de expressão de proteínas de choque térmico em presença e ausência do HCV por *qPCR Array*;
2. Selecionar as principais HSPs diferencialmente expressas;
3. Validar os resultados obtidos em três modelos virais distintos;
4. Silenciar a expressão das HSPs validadas e avaliar a replicação do HCV;
5. Superexpressar as Hsps validadas e avaliar a replicação do HCV;
6. Avaliar interações físicas entre as HSPs validadas e proteínas virais.

## 5 Referências Bibliográficas

AFDHAL, N. et al. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med**, v. 370, n. 16, p. 1483-93, Apr 17 2014.

ALI ASHFAQ, U. et al. Post-transcriptional inhibition of hepatitis C virus replication through small interference RNA. **Virol J**, v. 8, p. 112, 2011.

ALTER, H. J.; HOUGHTON, M. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. **Nat Med**, v. 6, n. 10, p. 1082-6, Oct 2000.

ALTER, M. J. HCV routes of transmission: what goes around comes around. **Semin Liver Dis**, v. 31, n. 4, p. 340-6, Nov 2011.

ANDRADE, A. F. et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 673-6, Sep 2006.

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.

BACON, B. R. et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med**, v. 364, n. 13, p. 1207-17, Mar 31 2011.

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

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.; PENIN, F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 482-96, Jul 2013.

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 02 1996.

BLANCHARD, E. et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. **J Virol**, v. 80, n. 14, p. 6964-72, Jul 2006.

BOSON, B. et al. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. e1002144, Jul 2011.

BOULANT, S.; TARGETT-ADAMS, P.; MCLAUCHLAN, J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 8, p. 2204-13, Aug 2007.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais**. 2012

\_\_\_\_\_. **Hepatites Virais Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação por Ano de Diagnóstico/Sintomas**. 2015

BRUGGMANN, P. et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. **J Viral Hepat**, v. 21 Suppl 1, p. 5-33, May 2014.

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

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

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

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

BUTT, A. A. et al. Do directly acting antiviral agents for HCV increase the risk of hepatic decompensation and decline in renal function? Results from ERCHIVES. **Aliment Pharmacol Ther**, Nov 4 2016.

CARTER, W.; CONNELLY, S.; STRUBLE, K. Reinventing HCV treatment: Past and Future Perspectives. **J Clin Pharmacol**, Sep 22 2016.

CASTRO, R. et al. Chronic Hepatitis C: An Overview of Evidence on Epidemiology and Management from a Brazilian Perspective. **Int J Hepatol**, v. 2015, p. 852968, 2015.

CHANDLER, D. E. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 9, p. e1002702, 2012.

CHAPPLE, J. P. et al. Neuronal DnaJ proteins HSP11a and HSP11b: a role in linking the Hsp70 chaperone machine to the ubiquitin-proteasome system? **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt 4, p. 640-2, Aug 2004.

CHEETHAM, M. E.; CAPLAN, A. J. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. **Cell Stress Chaperones**, v. 3, n. 1, p. 28-36, Mar 1998.

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

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

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

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, n. 2, p. 86-103, Summer 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.

CUI, G.; FANG, C.; HAN, K. Prediction of protein-protein interactions between viruses and human by an SVM model. **BMC Bioinformatics**, v. 13 Suppl 7, p. S5, 2012.

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

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

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

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

DOUAM, F.; PLOSS, A. Proteomic approaches to analyzing hepatitis C virus biology. **Proteomics**, v. 15, n. 12, p. 2051-65, Jun 2015.

DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. **J Hepatol**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S3-S13, Nov 2014.

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.

EINAV, S. et al. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. **J Virol**, v. 78, n. 20, p. 11288-95, Oct 2004.

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

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

FERRARIS, P.; BLANCHARD, E.; ROINGEARD, P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 9, p. 2230-7, Sep 2010.

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

FOSTER, G. R. et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. **N Engl J Med**, v. 373, n. 27, p. 2608-17, Dec 31 2015.

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

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

GELLER, R.; TAGUWA, S.; FRYDMAN, J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 698-706, Mar 2012.

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.

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

GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355, n. 6355, p. 33-45, Jan 02 1992.

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

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.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v. 61, n. 1S, p. S45-S57, Nov 2014.

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

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, Jul 2 2013.

HAYASHI, E. et al. Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1024-32, Mar 2005.

HERNANDEZ, M. P.; CHADLI, A.; TOFT, D. O. HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor. **J Biol Chem**, v. 277, n. 14, p. 11873-81, Apr 05 2002.

HEZODE, C. et al. Effectiveness of telaprevir or boceprevir in treatment-experienced patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 132-142 e4, Jul 2014.

HOOPER, P. L.; HIGHTOWER, L. E.; HOOPER, P. L. Loss of stress response as a consequence of viral infection: implications for disease and therapy. **Cell Stress Chaperones**, v. 17, n. 6, p. 647-55, Nov 2012.

HORNER, S. M. et al. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 35, p. 14590-5, Aug 30 2011.

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

JEE, H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. **J Exerc Rehabil**, v. 12, n. 4, p. 255-9, Aug 2016.

JIMENEZ-PEREZ, M. et al. Treatment of chronic hepatitis C with direct-acting antivirals: The role of resistance. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 29, p. 6573-81, Aug 07 2016.

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, Dec 16 2010.

JONES, D. M. et al. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. **J Virol**, v. 83, n. 5, p. 2163-77, Mar 2009.

JUO, L. Y. et al. HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles. **J Cell Sci**, v. 129, n. 8, p. 1661-70, Apr 15 2016.

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

KANWAL, F. et al. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 98-105, Jul 2014.

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

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

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

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

LANINI, S. et al. Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. **Clin Microbiol Infect**, Aug 11 2016.

LAWITZ, E. et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. **N Engl J Med**, v. 368, n. 20, p. 1878-87, May 16 2013.

LEMOS, M. A., JR. et al. Acupuncture needles can carry hepatitis C virus. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 35, n. 10, p. 1319-21, Oct 2014.

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

LIEBER, C. S. Alcohol and hepatitis C. **Alcohol Res Health**, v. 25, n. 4, p. 245-54, 2001.

LIM, S. O. et al. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 14, p. 2072-9, Apr 14 2005.

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

LINDENBACH, B. D. Virion assembly and release. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 369, p. 199-218, 2013.

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

LOHMANN, V. Hepatitis C virus RNA replication. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 369, p. 167-98, 2013.

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

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

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

MANN, S. P. et al. Hepatitis C virus infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17006, Mar 02 2017.

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.

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.

MCPHERSON, S. et al. No evidence of the unfolded protein response in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 2, p. 319-27, Feb 2011.

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.

MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77-87, Jan 2015.

MEYLAN, E. et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. **Nature**, v. 437, n. 7062, p. 1167-72, Oct 20 2005.

MOHD HANAFIAH, K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333-42, Apr 2013.

MORADPOUR, D.; PENIN, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 369, p. 113-42, 2013.

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

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

MOUREAU, G. et al. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117849, 2015.

MURPHY, D. G. et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 967-72, Mar 2015.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 699-708, Sep 2008.

MYMRIKOV, E. V.; SEIT-NEBI, A. S.; GUSEV, N. B. Large potentials of small heat shock proteins. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1123-59, Oct 2011.

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

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

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

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

PARENT, R. et al. The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 1798-809, Jun 2009.

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

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

PEPIN, J. et al. Evolution of the global burden of viral infections from unsafe medical injections, 2000-2010. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99677, 2014.

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

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.

PONZIANI, F. R. et al. Future of liver disease in the era of direct acting antivirals for the treatment of hepatitis C. **World J Hepatol**, v. 9, n. 7, p. 352-367, Mar 08 2017.

PRADAT, P. et al. Progression to cirrhosis in hepatitis C patients: an age-dependent process. **Liver Int**, v. 27, n. 3, p. 335-9, Apr 2007.

PROBST, A. et al. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. **J Viral Hepat**, v. 18, n. 11, p. 745-59, Nov 2011.

RAIMONDI, S. et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. **J Hepatol**, v. 50, n. 6, p. 1142-54, Jun 2009.

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

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

ROMERO-BREY, I. et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 12, p. e1003056, 2012.

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

RYDER, S. D. et al. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. **Gut**, v. 53, n. 3, p. 451-5, Mar 2004.

SAEED, M. et al. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 10, p. 5365-73, Oct 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.

SCHEEL, T. K.; RICE, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 837-49, Jul 2013.

SEJIMA, H. et al. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. **Virus Res**, v. 167, n. 1, p. 74-85, Jul 2012.

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

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

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

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

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

SOFIA, M. J. et al. Discovery of a beta-d-2'-deoxy-2'-alpha-fluoro-2'-beta-C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. **J Med Chem**, v. 53, n. 19, p. 7202-18, Oct 14 2010.

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

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.

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.

STERRENBURG, J. N.; BLATCH, G. L.; EDKINS, A. L. Human DNAJ in cancer and stem cells. **Cancer Lett**, v. 312, n. 2, p. 129-42, Dec 22 2011.

SULKOWSKI, M. S. et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. **N Engl J Med**, v. 370, n. 3, p. 211-21, Jan 16 2014.

TAI, A. W. et al. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 3, p. 298-307, Mar 19 2009.

TAKASHIMA, M. et al. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. **Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 2487-93, Dec 2003.

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

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

THEIN, H. H. et al. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 418-31, Aug 2008.

THRIFT, A. P.; EL-SERAG, H. B.; KANWAL, F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 2, p. 122-132, Feb 2017.

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

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.

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

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

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **J Hepatol**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S58-68, Nov 2014.

WU, T.; TANGUAY, R. M. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? **Cell Stress Chaperones**, v. 11, n. 1, p. 1-12, Spring 2006.

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

YU, X. et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. **Virology**, v. 367, n. 1, p. 126-34, Oct 10 2007.

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

## ***Capítulo II - Artigo Científico***

---

## Heat shock proteins HSPB8 and DNAJC5B have HCV antiviral activity

Braga, A. C. S.<sup>1</sup>; Carneiro B.M.<sup>2</sup>; Batista, M. N.<sup>1</sup>; Akinaga, M. M.<sup>1</sup>; Bittar, C.<sup>1</sup>; Rahal P.<sup>1</sup>

1 – Laboratório de estudos Genômicos, UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: anabragga@gmail.com

2- Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Rondonópolis, MT, Brazil

### Acknowledgments

This study was financially supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation) grant number 2013/17253-9.

Keywords: HCV, Hepatitis C, JFH-1, SGR-JFH-1, S52, genotype 2a, genotype 3, Heat shock proteins, HSP, chaperones, HSPB8, DNAJC5B, HSP22, CSP-β.

### Abstract

Hepatitis C is a disease caused by hepatitis C virus (HCV), and it is estimated that about 3% of world population are infected with the virus. During the virus replication, HCV interacts with several cellular proteins. Studies have shown that several heat shock proteins (HSPs) have an altered expression profile in the presence of the virus and some HSPs interact directly with HCV proteins. Thus the present study aimed to evaluate *in vitro* the expression levels of heat shock proteins in the presence and absence of HCV. The differential expression of 84 HSPs and chaperones was assessed by qPCR Array comparing HCV uninfected and infected Huh7.5 cells. To validate these results, the differentially expressed genes were tested by real-time PCR in three HCV different models: subgenomic HCV replicon cells (SGR-JFH-1), JFH-1 infected cells (both genotype 2a) and subgenomic S52 cells (genotype 3). The HSPB8 gene showed increased expression in all of three tested models. Then we promoted the silencing of HSPB8 and observed an increase in viral replication. In contrast, when we increased an expression of HSPB8, it was observed a decrease in HCV replication rate. The same procedure was adopted for the DNAJC5B and HCV showed replication pattern similar to that observed for the previous gene. These results suggest that HSPB8 may act as an intracellular factor against hepatitis C virus replication and DNAJC5B have the same function, but specific for genotype 3. We also evaluated direct interactions between HCV and HSP proteins and the results showed that HCV NS4B protein interact with HSPB8. These results can contribute for a better understanding of the mechanisms involved in HCV replication.

## 1 Introduction

Hepatitis C is a disease caused by the hepatitis C virus (HCV) and an estimated 115 million people are infected with the virus worldwide (Gower et al. 2014). Most patients are asymptomatic and are usually diagnosed only after a long period of time, resulting in complications such as cirrhosis, hepatic failure and hepatocarcinoma (Rantala and van de Laar 2008).

The classical treatment for hepatitis C was carried out with two drugs: interferon (IFN) alpha (either pegylated or not) and ribavirin (RBV). However, the use of this therapy, besides not achieving a good rate of sustained virologic response for certain genotypes, promote many side effects which sometimes led to discontinuation of treatment (Bartenschlager et al. 2013). Recently emerged new drugs with direct action to HCV, called DAAs (Direct-acting antivirals) as sofosbuvir, velpatasvir and Daclatasvir, reaching up to 97-100% of cure (Lanini et al. 2016). However the side effects are severe and in some cases has been reported the occurrence of hepatocellular carcinoma after a few years of treatment (Imran et al. 2014).

HCV is an enveloped virus of the family *Flaviviridae*, genus *Hepacivirus* (Giannini and Brechot 2003). The genome consists of a single-stranded positive RNA, which encodes a polyprotein precursor of approximately 3.000 amino acids, subsequently cleaved by cellular and viral proteases, originating structural proteins (core, E1, E2 and p7) and nonstructural proteins ( NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) (Bartenschlager et al. 2004; Moradpour et al. 2007).

Hepatitis C virus has six known genotypes and a seventh has been reported (Kuiken and Simmonds 2009; Murphy et al. 2015). Genotypes 1, 2 and 3 are widely distributed throughout the USA, Europe, Australia and East Asia (Japan, Thailand and China). Genotype 4 is usually identified in the Middle East, Egypt and

Central Africa. Genotypes 5 and 6 are predominantly in South Africa and Southeast Asia, respectively (Agha et al. 2004; Lee et al. 2006; Simmonds 1997).

Several cellular proteins are known to interact with HCV or be necessary for the viral replication process (Tai et al. 2009). Studies have shown that numerous heat shock proteins (HSPs) have an altered expression profile in the presence of the virus and some HSPs interact directly with HCV proteins, especially because the virus does not have HSPs and depend on these host proteins for the correct folding of the viral proteins (Geller et al. 2012; Hooper et al. 2012).

We can then observe the important role of heat shock proteins during viral infections. Thus, the objectives of the study was to identify the change of HSP profile that occurs in HCV viral presence to better understand mechanisms that lead to these changes.

## **2 Materials and methods**

### ***2.1 Cell culture and HCV replicon cells***

The human hepatoma cell line Huh7.5 was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1% (v/v) non-essential amino acids (Gibco Life Technologies, USA), 100 units/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

The replicons used in the present study were SGR-Feo-JFH-1, a bicistronic subgenomic replicon based on the JFH-1 sequence (genotype 2a), which possesses the firefly luciferase gene fused to a neomycin resistance gene and non-structural HCV proteins (Wyles et al. 2009) and the JFH-1 replicon, a full HCV genome construct (Wakita et al. 2005) and another subgenomic replicon S52-SG-Feo (genotype 3).

Huh7.5 cells were electroporated with either SGR-Feo-JFH-1, S52-SG-Feo or JFH-1 RNA. Cells expressing SGR-Feo-JFH-1 and S52-SG-Feo were selected for 21 days with 800 µg/mL G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The electroporated JFH-1 cells were cultivate for 17 days after electroporation and subsequently stored. For all experiments, the cells were plated 24 hours prior to the start of treatments at initial following cell densities:  $1 \times 10^5$  cells/well for a 6-well-plate and  $5 \times 10^3$  cell/well for a 96-well-plate.

## **2.2 qPCR array to HSPs**

To analyze the gene expression of 84 heat shock proteins we used RT<sup>2</sup> PCR Array Human Heat Shock Proteins & Chaperones (Qiagen) comparing the mock uninfected and infected Huh7.5 cells. They were initially lysed in Trizol reagent and then subjected to RNA extraction using the RNeasy Micro Kit (Qiagen) following the manufacturer's specifications. Samples were quantified and cDNA synthesis was obtained by RT<sup>2</sup> First Strand kit (Qiagen). The data were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method using the platform provided by the company Qiagen available in <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>

### ***2.3 Validation of the results obtained by PCR Array***

In order to confirm the qPCR Array results, we provided validation by qPCR technique that was performed in three different models of viral replication: Huh7.5/JFH-1, Huh7.5/SGR-JFH-1 Feo and Huh7.5/S52. Total RNA of cells was extracted and then converted into cDNA. The samples were subjected to qPCR using specific primers previously synthesized. As endogenous control was assessed the expression of GAPDH gene. The results were obtained by relative expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) with standardized cell line without viral replication (Huh7.5).

### ***2.4 RNAi molecules and transfection***

For knocking down HSPB8 and DNAJC5B genes, commercial siRNAs were obtained (EHU160791 - Sigma for HSPB8 and EHU046751 - Sigma for DNAJC5B). As a control, we used a commercial Negative Control (siRNA#1-NC1) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with no specificity to any HCV sequence used or cellular mRNA in the present study. Different siRNA concentrations (0.1, 1 or 5 nM) were transfected into the cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The data were normalized with mock values (Lipofectamine only).

### ***2.5 Gene expression vectors***

To increase the expression of the target genes the expression vectors pcDNA3.1/HSPB8 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) and pCMV6/DNAJC5B (OriGene Technologies, USA) were used. As control, the backbone expression vectors were used. About 10  $\mu$ g of each vector were transfected using the reagent

Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's specifications. The data were normalized with mock values (Lipofectamine only).

## ***2.6 Cell viability***

The cellular cytotoxicity was determined using an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cytotoxicity was assessed in 96-well-plates at 72 h after the cells were transfected with siRNAs or vectors. After the appropriate incubation time, the supernatant was removed, and 100  $\mu$ l of 1 mg/mL of MTT reagent was dissolved in FBS-free DMEM culture medium and added to the cells. After 30 minutes at 37°C, the MTT solution was removed, and 100  $\mu$ l of DMSO was added (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The absorption measurements were performed at 562 nm on a spectrophotometric plate reader (FLUOstar Omega/BMG LABTECH, Offenburg, BW, DE).

## ***2.7 RNA isolation and qPCR***

Total RNA from transfected cells was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 2  $\mu$ g of extracted RNA was used for cDNA synthesis with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The gene expression levels and HCV replication rate (JFH-1)

were determined by real-time PCR using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, CA, USA). GAPDH gene expression was analyzed as an endogenous control. Primer sequences are described in the supplementary material 1. The value of the relative expression was obtained after calculating  $\Delta\Delta C_t$ .

## **2.8 Luciferase assay**

To assess the HCV replication level, we evaluated the luciferase activity of stably transfected Huh7.5/SGR-Feo-JFH-1 cells or Huh7.5 S52/SG-Feo cells. About 72 hours after the treatment of interest, the cells were disrupted with 30  $\mu$ L of passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA), and the luciferase substrate (Promega, Madison, WI, USA) was automatically added to each plate well. Luciferase activity was measured using a luminometer (FLUOstar Omega/BMGLABTECH, Offenburg, BW, DE).

## **2.9 Co-IP assay**

The IP was performed using Pierce Protein A Agarose (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's specifications. Proteins were extracted from Huh7.5/SGR-Feo-JFH-1 cells or Huh7.5 S52/SG-Feo cells using Cellytic MT (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). Cell debris was decanted by centrifugation at 10 minutes, 12000g at 4°C. The supernatant was incubated with 10  $\mu$ L HCV Antibody NS4B (MA17616) (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) overnight at 4°C under stirring. The IP was performed using 200  $\mu$ L of Pierce Protein A Agarose (Thermo Fisher Scientific)

and incubated for 2 hours at room temperature under stirring. The beads were washed (5x) with 25mM Tris/150mM NaCl buffer. The beads were resuspended in Loading Buffer and denatured for 5 minutes at 95°C. A Western blot assay was performed in 10% denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). After blocking with 5% (w/v) non-fat milk diluted in TBS-T, membranes were incubated with primary antibodies: NS4B (MA17616) (Thermo-Scientific-Pierce, Rockford, IL, USA), at dilution 1:3000; HSPB8 (OTI1E3) (OriGene Technologies, USA), at dilution 1:2000, overnight at 4°C, followed by further incubation with secondary antibodies anti-mouse (HRP) (AB6728) (Abcam, Cambridge, MA, USA) at dilution 1:10000. The membrane was finally incubated with the Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo-Scientific-Pierce, Rockford, IL, USA) and luminescence was captured on a Chemi-Doc System (Bio-Rad, Amadora, PT).

### ***2.10 Statistical analysis***

Three independent experiments were performed in triplicate. The results of the expression of SGR-Feo-JFH-1, JFH-1, S52/SG-Feo and MTT were calculated as a percentage of the mock (medium with Lipofectamine reagent only). All statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's post test using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A P value <0.05 was considered statistically significant.

### 3 Results

#### 3.1 qPCR array and validation of results

To evaluate the expression of heat shock proteins in cells infected by HCV gene expression assay by qPCR Array was performed. The cell line Huh7.5/JFH-1 had RNA extracted and converted into cDNA. The same procedure was carried out in Huh7.5 uninfected cell line for comparison. The gene expression values obtained are shown in Table 1 and highlighted were the top 10 genes that showed variation in their expression in cells infected with HCV.

Table 1: Analysis of gene expression obtained by qPCR array for Huh7.5/JFH-1 standard with Huh7.5.

| Gene         | Expression<br>Log <sub>2</sub> (SD) | Gene           | Expression<br>Log <sub>2</sub> (SD) | Gene         | Expression<br>Log <sub>2</sub> (SD) |
|--------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| ADCK3        | -1.71 (0.26)                        | DNAJB6         | 1.05 (0.03)                         | HSP90AB1     | 1.13 (0.18)                         |
| ATF6         | 0.95 (1.83)                         | DNAJB7         | 0.36 (2.64)                         | HSP90B1      | 1.25 (0.04)                         |
| BAG1         | 1.07 (0.04)                         | DNAJB8         | 1.42 (0.17)                         | HSPA14       | 1.08 (0.08)                         |
| BAG2         | 1.07 (0.01)                         | DNAJB9         | 1.30 (1.07)                         | HSPA1A       | 1.12 (0.04)                         |
| BAG3         | 1.55 (0.35)                         | DNAJC1         | 1.83 (0.57)                         | HSPA1B       | 1.15 (0.18)                         |
| BAG4         | 1.14 (0.14)                         | DNAJC10        | 1.53 (0.06)                         | HSPA1L       | -1.31 (0.31)                        |
| BAG5         | 1.35 (0.14)                         | DNAJC11        | 1.14 (0.17)                         | HSPA2        | -1.14 (0.12)                        |
| <b>CCS</b>   | <b>1.87 (0.08)</b>                  | <b>DNAJC12</b> | <b>2.49 (0.26)</b>                  | HSPA4        | 1.23 (0.07)                         |
| CCT2         | -1.05 (0.05)                        | DNAJC13        | 1.82 (0.15)                         | HSPA4L       | 1.62 (0.03)                         |
| CCT3         | -1.29 (0.33)                        | DNAJC14        | 1.07 (0.06)                         | HSPA5        | 1.26 (0.10)                         |
| CCT4         | -1.28 (0.32)                        | DNAJC15        | 1.24 (0.02)                         | <b>HSPA6</b> | <b>2.03 (0.43)</b>                  |
| CCT5         | 1.07 (0.01)                         | DNAJC16        | 1.22 (0.15)                         | HSPA8        | (1.05 (0.06)                        |
| CCT6A        | -1.22 (0.09)                        | <b>DNAJC17</b> | <b>4.11 (1.12)</b>                  | HSPA9        | 1.54 (0.05)                         |
| <b>CCT6B</b> | <b>1.94 (0.13)</b>                  | DNAJC18        | 1.48 (0.19)                         | HSPB1        | 1.55 (0.35)                         |
| CCT7         | -1.08 (0.05)                        | DNAJC21        | 1.28 (0.05)                         | HSPB2        | Undetermined                        |
| CRYAA        | Undetermined                        | DNAJC3         | 1.82 (0.37)                         | HSPB3        | Undetermined                        |
| CRYAB        | 1.79 (0.00)                         | DNAJC4         | 1.12 (0.09)                         | <b>HSPB6</b> | <b>1.96 (0.30)</b>                  |
| DNAJA1       | 1.09 (0.03)                         | DNAJC5         | -1.19 (0.18)                        | HSPB7        | 1.24 (0.02)                         |
| DNAJA2       | 1.18 (0.06)                         | <b>DNAJC5B</b> | <b>3.27 (1.82)</b>                  | <b>HSPB8</b> | <b>4.18 (1.13)</b>                  |
| DNAJA3       | 1.20 (0.13)                         | DNAJC5G        | Undetermined                        | HSPD1        | 1.09 (0.06)                         |
| DNAJA4       | -1.48 (0.52)                        | <b>DNAJC6</b>  | <b>1.85 (0.02)</b>                  | HSPE1        | -1.51 (0.76)                        |
| DNAJB1       | 1.26 (0.18)                         | DNAJC7         | 1.19 (0.02)                         | HSPH1        | 1.37 (0.02)                         |
| DNAJB11      | 1.18 (0.05)                         | DNAJC8         | 1.39 (0.10)                         | PFDN1        | 1.20 (0.09)                         |
| DNAJB12      | 1.05 (0.03)                         | DNAJC9         | -1.27 (0.31)                        | PFDN2        | 1.11 (0.06)                         |

|         |              |             |                   |          |              |
|---------|--------------|-------------|-------------------|----------|--------------|
| DNAJB13 | -1.38 (0.48) | HSF1        | 1.18 (0.07)       | SERPINH1 | -1.77 (0.29) |
| DNAJB14 | 1.72 (0.05)  | HSF2        | 1.28 (0.03)       | SIL1     | 1.15 (0.12)  |
| DNAJB2  | 1.82 (0.16)  | <b>HSF4</b> | <b>1.9 (0.22)</b> | TCP1     | -1.16 (0.17) |
| DNAJB5  | 1.50 (0.31)  | HSP90AA1    | 1.10 (0.09)       | TOR1A    | 1.25 (0.04)  |

In order to validate these results specific primers were designed to genes highlighted in Table 1. In addition to the viral model Huh7.5/JFH-1 two other models (SGR-JFH-1 Feo and S52/SG-Feo cell lines) were used to confirm the occurrence of these variations in the expression of HSPs. The results of gene expression are plotted on the graph in Log<sub>2</sub> scale (Figure 1). We adopted an arbitrary value of  $\geq 2$  for the cutoff (Pfaffl 2001).

Three genes presented validation of the results. The HSPB8 gene has increased expression values in all evaluated viral models and the DNAJC5B and HSPA6 genes surpassed the 2 Logs value in the S52 model, for genotype 3.

It has already been shown that the HSPA6 protein interacts with the 3'NCR region of HCV and therefore we chose to study the other two validated genes (Harris et al. 2006; Khachatoorian and French 2016).

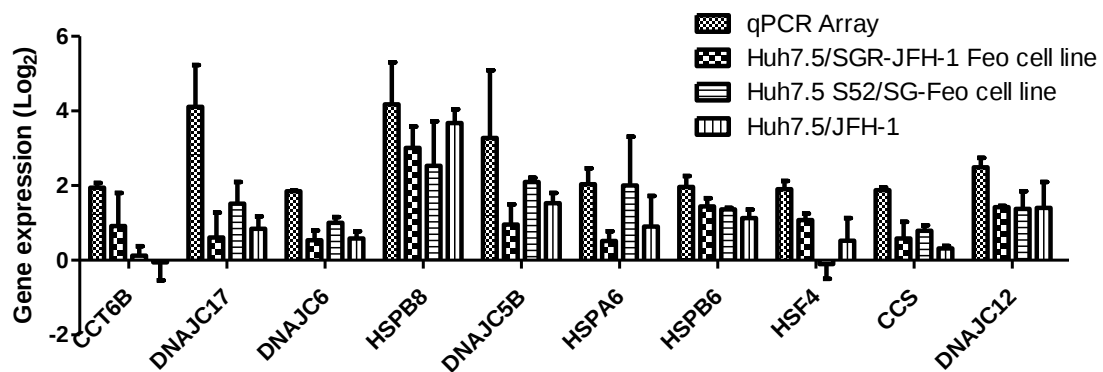


Figure 1: Analysis by qPCR Array HSPs showing 10 genes that showed the highest levels of variation in gene expression and validation with SGR-JFH-1 Feo, JFH-1 and S52/SG-Feo viral models. Samples were normalized with Huh7.5.

### 3.2 The role of HSPB8 gene in HCV replication

The HSPB8 gene showed an increase in gene expression in the three tested viral models, confirming the values obtained in qPCR Array test. To better understand their role in HCV replication we inhibited the expression of this gene to assess the rate of viral replication. For this we used specific siRNA molecules to inhibit HSPB8 and confirmed its inhibition by qPCR (Figure 2A) and cell viability (Figure 2B). The three tested concentrations of siRNA did not significantly alter cell viability and concentrations of 1 nM and 5 nM were able to silence the HSPB8 gene.

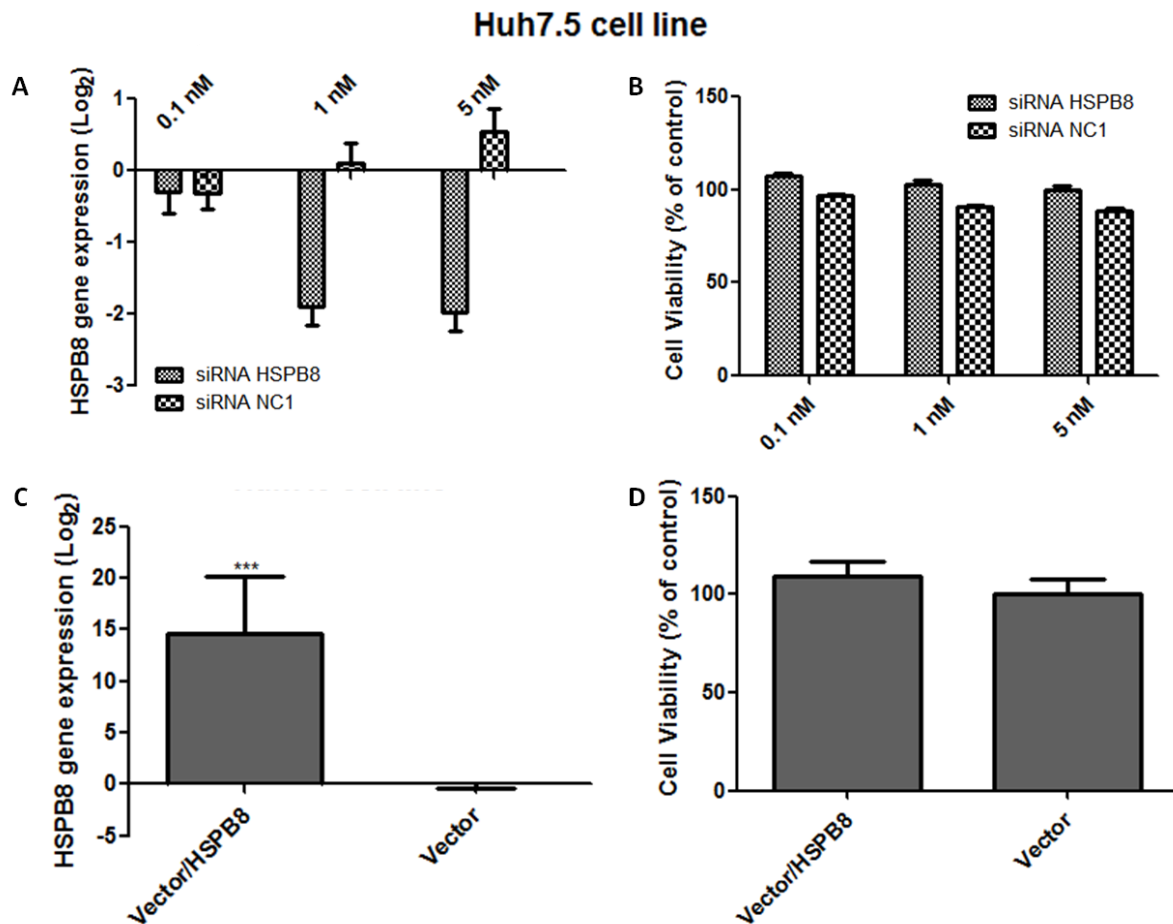


Figure 2: HSPB8 gene expression and cell viability on Huh7.5 cell line. A: Gene expression of HSPB8 by qPCR in cell line transfected with siRNA for HSPB8 at concentrations of 0.1 nM, 1 nM and 5 nM. B: Cell viability by MTT assay in cell line transfected with siRNA for HSPB8 at three concentrations. As control was used a scrambled siRNA (NC1). C: Gene expression of HSPB8 by qPCR in cell line transfected with HSPB8 vector. D: Cell viability by MTT assay in

cell line transfected with HSPB8 vector. As control was used an empty vector. All assays were performed at 72 hours post-transfection and the data were normalized with mock values (transfection reagent only). \*\*\* $P < 0.0001$  vs. Mock.

After that, the cell lines of viral models were transfected with siRNA against HSPB8 mRNA. When the translation of this cellular protein was inhibited we observed an increase in virus replication in all analyzed viral models in more than 20% (Figure 3A-C). In the subgenomic models the concentration of 5 nM in the control siRNA significantly altered the HCV replication and the data generated in this concentration were not taken into account (Figure 3A and B).

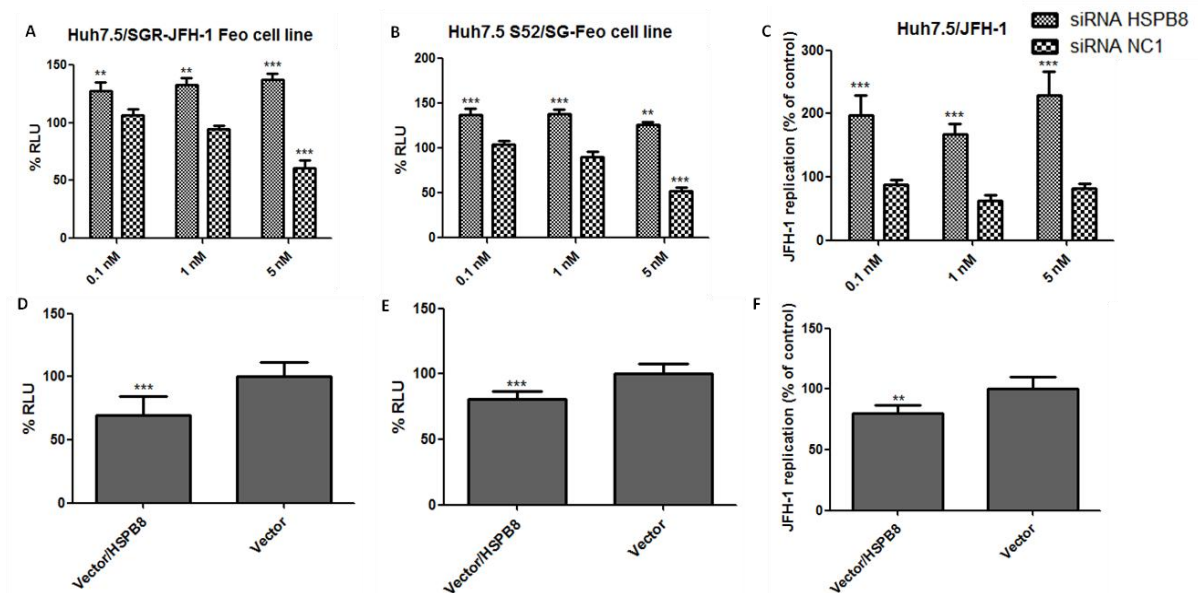


Figure 3: HCV replication in three different viral models. A: HCV replication by luciferase assay on Huh7.5/SGR-JFH-1 Feo cells treated with siRNA HSPB8 and negative control (siRNA NC1) at concentrations of 0.1 nM, 1 nM and 5 nM. B: HCV replication by luciferase assay on Huh7.5 S52/SG-Feo cells. C: HCV replicaion by qPCR on Huh7.5/JFH-1 cells. D: HCV replication by luciferase assay on Huh7.5/SGR-JFH-1 Feo cells treated with vector/HSPB8 and empty vector. E: HCV replication by luciferase assay on Huh7.5 S52/SG-Feo cells. F: HCV replicaion by qPCR on Huh7.5/JFH-1 cells. All assays were performed at 72 hours post-transfection and the data were normalized with mock values (transfection reagent only). \*\*\* $P < 0.0001$  vs. Mock.

To confirm the observed effect on viral replication we performed the reverse procedure by increasing the expression of the HSPB8 gene using an expression

vector. First, we confirmed the increase in target gene expression (Figure 2C) and assessed cell viability (Figure 2D). We then proceeded to increase the expression of HSPB8 in all three viral models and in all cases we observed a decrease of viral replication by at least 20% in relation of control (empty vector) (Figure 3D-F).

### ***3.3 The role of DNAJC5B gene in HCV replication***

The DNAJC5B gene was validated in genotype 3 HCV strain (S52). Thus it was performed the inhibition of the target gene with a siRNA. The cell viability assay and confirmation of gene inhibition are shown in Figure 4A and B). From the concentration of 1 nM it is possible to observe silencing of the target gene and no siRNA molecule capable of altering the viability of the cells.

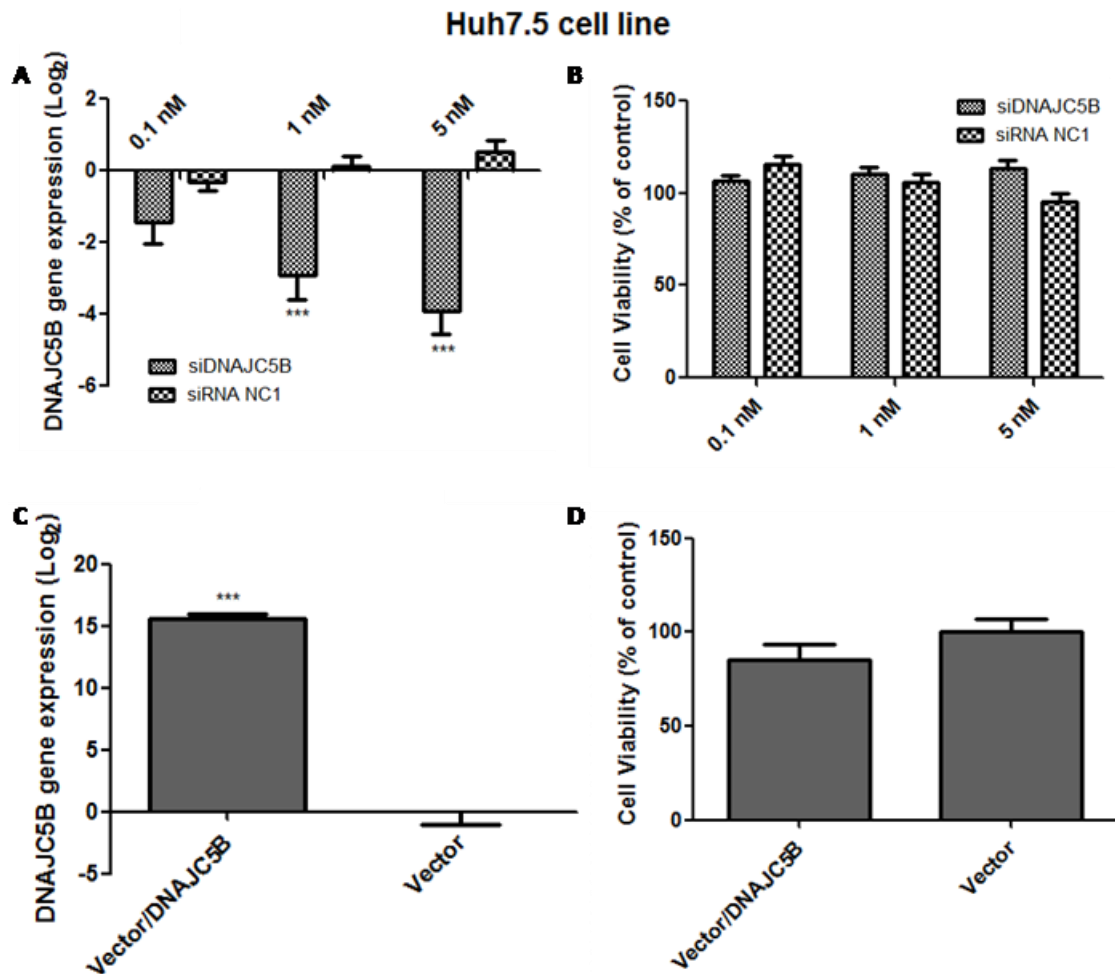


Figure 4: DNAJC5B gene expression and cell viability on Huh7.5 cell line. A: Gene expression of HSPB8 by qPCR in cell line transfected with siRNA for DNAJC5B at concentrations of 0.1 nM, 1 nM and 5 nM. B: Cell viability by MTT assay in cell line transfected with siRNA for HSPB8 at three concentrations. As control was used a scrambled siRNA (NC1). C: Gene expression of DNAJC5B by qPCR in cell line transfected with DNAJC5B vector. D: Cell viability by MTT assay in cell line transfected with DNAJC5B vector. As control was used an empty vector. All assays were performed at 72 hours post-transfection and the data were normalized with mock values (transfection reagent only). \*\*\*P<0.0001 vs. Mock.

After confirming the viability and efficiency of the DNAJC5B siRNA molecule, transfection was performed on the Huh7.5 S52/SG-Feo cell line. The results also show an increase in viral replication in the reduced expression of this cellular protein (Figure 5A).

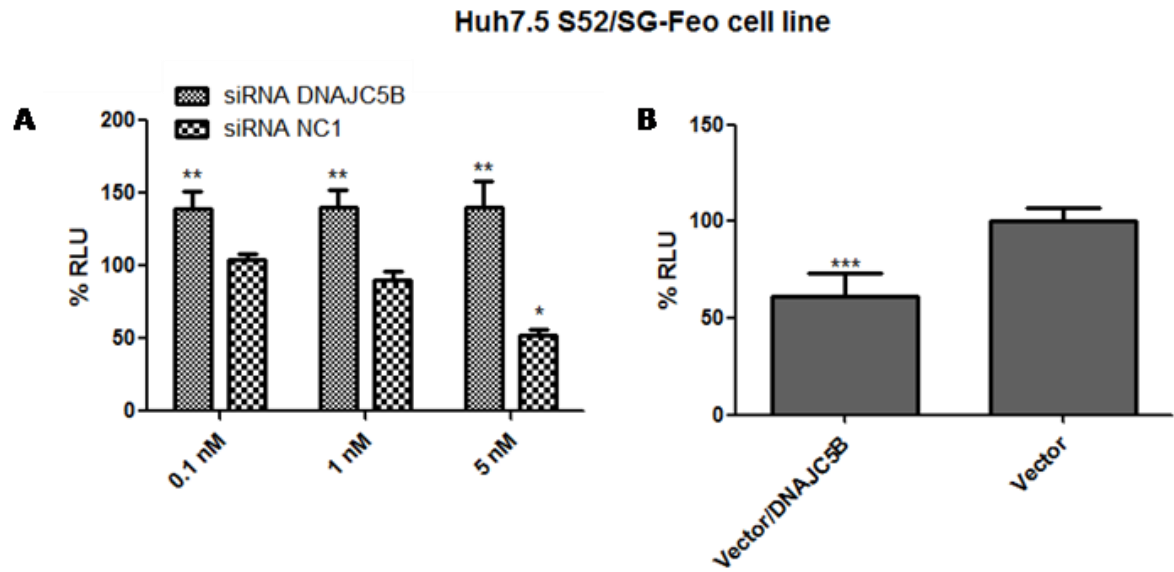


Figure 5: HCV replication in genotype 3 viral models. A: HCV replication by luciferase assay on Huh7.5 S52/SG-Feo cells treated with siRNA DNAJC5B and negative control (siRNA NC1) at concentrations of 0.1 nM, 1 nM and 5 nM. B: HCV replication by luciferase assay on S52/SG-Feo cells treated with vector/DNAJC5B and empty vector. All assays were performed at 72 hours post-transfection and the data were normalized with mock values (transfection reagent only). \*\*\*P<0.0001 vs. Mock.

To confirm the role of this protein in HCV replication we also increased the expression of DNAJC5B. The values of gene expression and cell viability are shown in figure 4C and D. The expression of HCV, genotype 3, was reduced by more than 40% when DNAJC5B was overexpressed (Figure 5B).

### 3.4 Protein-protein interaction

In order to evaluate whether, a direct interaction between the proteins could be occurring, we performed the co-immunoprecipitation assay. The NS4B viral protein was precipitated by a specific antibody and subsequently we performed a western blot assay and detected the presence of HSPB8. This phenomenon was observed for both genotypes of HCV (Figure 6A and B).

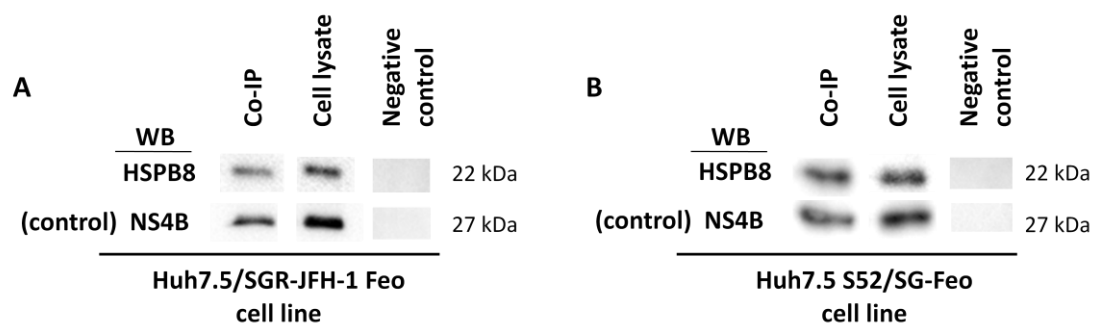


Figure 6: Co-immunoprecipitation assay (Co-IP). NS4B viral protein immunoprecipitated on specific antibody in Bead Agarose A cell lysate. As negative control the immunoprecipitation reaction was performed without antibody to NS4B WB: Western blot detection for specific proteins NS4B (Co-IP control) and HSPB8. A: Assay performed on cell line Huh7.5 / SGR-JFH-1 Feo. B: Assay performed on Huh7.5 S52 / SG-Feo cell line.

## 4 Discussion

Hepatitis C virus infection modulates the expression of several cellular proteins to promote viral replication. In our study, we observed that HCV alters the expression of many heat shock proteins and chaperones. Increased expression of the HSPB8 and DNAJC5B genes observed in the qPCR Array could indicate that these proteins would promote HCV replication or be expressed by the cell due to the stress caused by the viral infection.

HSPB8 (or HSP22) belongs to the small heat shock proteins ubiquitously expressed in practically all tissues (Verschuure et al. 2003). HSPB8 prevents accumulation of aggregated proteins in the cell and participates in the regulation of proteolysis of unfolded proteins (Wilhelmus et al. 2006). Furthermore, HSPB8 also seems to be directly or indirectly involved in regulation of apoptosis and carcinogenesis, contributes to cardiac cell hypertrophy and survival and, when mutated, might be involved in development of neurodegenerative diseases (Crippa et al. 2010; Gober et al. 2003; Mymrikov et al. 2011; Trent et al. 2007).

The validation of the HSPB8 gene, in all tested viral models (for both genotype 2a and genotype 3), is an interesting result since the identification of a gene that has a similar expression profile for several genotypes, evidencing a more embracing cellular mechanism. Previous studies have shown that HSPB8 protein is more expressed in HCV-infected Huh7.5 cells, corroborating with our results (Blackham et al. 2010).

HSPB8 silencing promoted an increase in viral replication in all models tested and increased gene expression led to an opposite effect (reduction of HCV). These results may suggest that this protein is expressed as a form of cellular defense against viral infection, and that in some way not yet understood HSPB8 can decrease the replication of HCV.

There are no data that relate the HSPB8 protein to a cellular defense mechanism to viral infections. However, this function has already been described for another protein belonging to the family of small heat shock proteins, HSP27. Studies have shown that, when inhibited by siRNA, HSP27 promoted a nearly two-fold increase in Hepatitis B virus (HBV) production when compared to control cells. In addition, when there was overexpression of HSP27, there was a decrease in HBV production, suggesting that HSP27 functioned as an endogenous anti-HBV factor. The study further demonstrated that HSP27 expression activated type I IFN (Tong et al. 2013).

We identified, for the first time, that HSPB8 showed direct interaction with the viral protein NS4B, which participates in several stages of HCV replication. Previous studies had shown that NS4B interacted with others HSPs such as HSP70, HSPA8 and HSP90B1 (Chen et al. 2010; Li et al. 2012).

Cysteine string proteins (CSPs) are a DnaJ chaperone family and are associated with regulated secretory organelles in organisms ranging from fruit flies to man and in Mammals have three CSP genes ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) (Fernandez-Chacon et al. 2004).

The DNAJC5B, also known as CSP- $\beta$  gene, was higher expressed and validated only in the Huh7.5 S52/SG Feo strain (genotype 3). Its inhibition by RNAi also promoted an increase in viral replication and superexpression promoted viral reduction, thus indicating a cellular protection factor. However, the occurrence of this phenomenon only in genotype 3 may aid in the elucidation of some factors that are observed only in this genotype, such as the increase of hepatic steatosis, insulin resistance and the differential response to medication and occurrence of viral resistance (Abenavoli et al. 2014; Gane et al. 2015; Kanwal et al. 2014). This protein is still poorly studied. Some studies report that tissues such as testis and brain have a higher

expression of DNAJC5B, probably acting in several secretory pathways (Boal et al. 2007; Gundersen et al. 2010).

In our study we observed that the increase in Hsps expression is not caused in order to promote viral replication but rather a possible cellular defense technique that aims to reduce viral replication. The mechanisms involved in this process and the possible interactions of these chaperones with viral proteins still need to be elucidated.

## 5 References

- Abenavoli L, Masarone M, Peta V, Milic N, Kobylak N, Rouabhia S, Persico M (2014) Insulin resistance and liver steatosis in chronic hepatitis C infection genotype 3 World journal of gastroenterology 20:15233-15240 doi:10.3748/wjg.v20.i41.15233
- Agha S et al. (2004) 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 73:216-222 doi:10.1002/jmv.20078
- Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence Adv Virus Res 63:71-180 doi:10.1016/S0065-3527(04)63002-8
- Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection Nature reviews Microbiology 11:482-496 doi:10.1038/nrmicro3046
- Blackham S, Baillie A, Al-Hababi F, Remlinger K, You S, Hamatake R, McGarvey MJ (2010) Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus Journal of virology 84:5404-5414 doi:10.1128/JVI.02529-09
- Boal F, Le Pevelen S, Cziepluch C, Scotti P, Lang J (2007) Cysteine-string protein isoform beta (Cspbeta) is targeted to the trans-Golgi network as a non-palmitoylated CSP in clonal beta-cells Biochimica et biophysica acta 1773:109-119 doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.054
- Chen YJ et al. (2010) Heat shock protein 72 is associated with the hepatitis C virus replicase complex and enhances viral RNA replication The Journal of biological chemistry 285:28183-28190 doi:10.1074/jbc.M110.118323
- Crippa V et al. (2010) A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases Autophagy 6:958-960 doi:10.4161/auto.6.7.13042
- Fernandez-Chacon R et al. (2004) The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration Neuron 42:237-251
- Gane EJ, Hyland RH, An D, Svarovskaia E, Pang PS, Brainard D, Stedman CA (2015) Efficacy of ledipasvir and sofosbuvir, with or without ribavirin, for 12 weeks in patients with HCV genotype 3 or 6 infection Gastroenterology 149:1454-1461 e1451 doi:10.1053/j.gastro.2015.07.063
- Geller R, Taguwa S, Frydman J (2012) Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication Biochimica et biophysica acta 1823:698-706 doi:10.1016/j.bbamcr.2011.11.007
- Giannini C, Brechot C (2003) Hepatitis C virus biology Cell Death Differ 10 Suppl 1:S27-38 doi:10.1038/sj.cdd.4401121
- Gober MD, Smith CC, Ueda K, Toretzky JA, Aurelian L (2003) Forced expression of the H11 heat shock protein can be regulated by DNA methylation and trigger apoptosis in human cells The Journal of biological chemistry 278:37600-37609 doi:10.1074/jbc.M303834200
- Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H (2014) Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection Journal of hepatology 61:S45-S57 doi:10.1016/j.jhep.2014.07.027
- Gundersen CB, Kohan SA, Souda P, Whitelegge JP, Umbach JA (2010) Cysteine string protein beta is prominently associated with nerve terminals and secretory organelles in mouse brain Brain research 1332:1-11 doi:10.1016/j.brainres.2010.03.044
- Harris D, Zhang Z, Chaubey B, Pandey VN (2006) Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome Molecular & cellular proteomics : MCP 5:1006-1018 doi:10.1074/mcp.M500429-MCP200

- Hooper PL, Hightower LE, Hooper PL (2012) Loss of stress response as a consequence of viral infection: implications for disease and therapy *Cell stress & chaperones* 17:647-655 doi:10.1007/s12192-012-0352-4
- Imran M et al. (2014) Current and future therapies for hepatitis C virus infection: from viral proteins to host targets *Arch Virol* 159:831-846 doi:10.1007/s00705-013-1803-7
- Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, Duan Z, El-Serag HB (2014) HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV *Hepatology* 60:98-105 doi:10.1002/hep.27095
- Khachatoorian R, French SW (2016) Chaperones in hepatitis C virus infection *World journal of hepatology* 8:9-35 doi:10.4254/wjh.v8.i1.9
- Kuiken C, Simmonds P (2009) Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus *Methods in molecular biology* 510:33-53 doi:10.1007/978-1-59745-394-3\_4
- Lanini S, Easterbrook PJ, Zumla A, Ippolito G (2016) Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2016.07.035
- Lee CM et al. (2006) Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan *Intervirology* 49:76-81 doi:10.1159/000087267
- Li S, Yu X, Guo Y, Kong L (2012) Interaction networks of hepatitis C virus NS4B: implications for antiviral therapy *Cellular microbiology* 14:994-1002 doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01773.x
- Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus *Nature reviews Microbiology* 5:453-463 doi:10.1038/nrmicro1645
- Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Tremblay CL (2015) Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa *J Clin Microbiol* 53:967-972 doi:10.1128/JCM.02831-14
- Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB (2011) Large potentials of small heat shock proteins *Physiological reviews* 91:1123-1159 doi:10.1152/physrev.00023.2010
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucleic acids research* 29:e45
- Rantala M, van de Laar MJ (2008) Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review *Euro Surveill* 13
- Simmonds P (1997) Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes *Gut* 40:291-293
- Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim SS, Sakamoto N, Xavier RJ, Chung RT (2009) A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication *Cell Host Microbe* 5:298-307 doi:10.1016/j.chom.2009.02.001
- Tong SW et al. (2013) HSPB1 is an intracellular antiviral factor against hepatitis B virus *J Cell Biochem* 114:162-173 doi:10.1002/jcb.24313
- Trent S, Yang C, Li C, Lynch M, Schmidt EV (2007) Heat shock protein B8, a cyclin-dependent kinase-independent cyclin D1 target gene, contributes to its effects on radiation sensitivity *Cancer research* 67:10774-10781 doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1475
- Verschuure P, Tatard C, Boelens WC, Grongnet JF, David JC (2003) Expression of small heat shock proteins HspB2, HspB8, Hsp20 and cvHsp in different tissues of the perinatal developing pig *European journal of cell biology* 82:523-530 doi:10.1078/0171-9335-00337
- Wakita T et al. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome *Nature medicine* 11:791-796 doi:10.1038/nm1268
- Wilhelmus MM et al. (2006) Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta toxicity *Acta neuropathologica* 111:139-149 doi:10.1007/s00401-005-0030-z
- Wyles DL, Kaihara KA, Korba BE, Schooley RT, Beadle JR, Hostetler KY (2009) 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 Antimicrobial agents and chemotherapy 53:2660-2662  
doi:10.1128/AAC.01546-08

## 6 Supplementary Material

Supplementary material 1: Sequence of PCR primers used in the study.

| <b>Gene</b>    | <b>Sequence 5'-3'</b>                                 | <b>Size</b> |
|----------------|-------------------------------------------------------|-------------|
| <b>CCS</b>     | F - TCCTACAGCTGACCCCTGAG<br>R - TAAGGTCCCCGTACTGATGG  | 99          |
| <b>DNAJC5B</b> | F - AAACGGTGGAACAGTTTTGC<br>R - GCTCCCTTATGCAGACCAAG  | 120         |
| <b>DNAJC12</b> | F - GTTTCGAGGGAAGAAGGAC<br>R - CTGCCAGGATTTGTTCAACC   | 133         |
| <b>DNAJC17</b> | F - GCCTGAGAGAAGAGGGTTCC<br>R - TTCTGCCTTTCTCTCAACC   | 101         |
| <b>HSPA6</b>   | F - TTGACGCTGGTGTCTTTGAG<br>R - TCCATGAAGTGGTTCACGAG  | 94          |
| <b>HSPB6</b>   | F - TCTCACCCACTCCTGGATTC<br>R - GTGCTGGTAGGGTCTGGAAG  | 149         |
| <b>HSPB8</b>   | F - TGTCCAGCACGTTCTCAAAG<br>R - CACAGGGGACAGAAGAAAGG  | 105         |
| <b>CCT6B</b>   | F - TCTTCGCAGAGCAAAAAGAAG<br>R - CAGCATGTCCCAAGCAATC  | 107         |
| <b>DNAJC6</b>  | F - TGGATTCCAGACATCTTGACC<br>R - TTCCGACACACAGCAAAAAG | 148         |
| <b>HSF4</b>    | F - GTTTCCTCGTAAGCGACCAG<br>R - TCCGAAAACCGTACATGTTG  | 111         |
| <b>HCV</b>     | F - CTCCGCCATGAATCACTC<br>R - ACGACACTCATACTAACGC     | 120         |

### ***Capítulo III - Conclusão***

---

## 1 Considerações finais

A infecção pelo vírus da hepatite C acarreta diversas consequências aos pacientes e em alguns casos essas alterações podem levar à morte. Isso ocorre porque a presença do vírus altera boa parte da maquinaria celular, comprometendo o perfeito funcionamento dos hepatócitos. Muitas dessas alterações são promovidas pelo próprio HCV de forma a facilitar e promover sua replicação. Por outro lado, a célula também pode modificar sua expressão gênica na tentativa de se defender e eliminar a infecção.

Proteínas de choque térmico desempenham diversas funções e nos casos de infecções virais sua principal atividade está relacionada à defesa celular em condições de estresse.

A avaliação da expressão gênica das principais proteínas de choque térmico e chaperonas obtida na primeira etapa do presente trabalho fornece uma grande quantidade de informações com relação às alterações que o HCV promove nas células hepáticas. Os resultados demonstraram ainda que a maioria das HSPs tiveram um aumento em sua expressão gênica, o que poderia indicar que essas proteínas estariam atuando no processo de defesa da célula à infecção. Entretanto esse fenômeno deve ser analisado com cautela, visto que alguns trabalhos já demonstraram que o próprio vírus necessita de algumas HSPs para realizar sua replicação, como é o caso da HSP90 (NAKAGAWA et al., 2007).

Outro fator importante a ser discutido é o fato de que o critério adotado neste estudo para a escolha dos genes a serem avaliados foi arbitrado por questões de ordem prática e não significam, de forma alguma, que os demais genes não analisados não possam desempenhar atividades importantes no curso da infecção pelo HCV. Diversas HSPs não estudadas no presente trabalho já tiveram sua relação com o vírus demonstrada por outros pesquisadores (KHACHATOORIAN; FRENCH, 2016). Dessa forma, os dados gerados pela técnica de qPCR *array* forneceram uma grande quantidade de informações importantes acerca do impacto que a infecção pelo HCV pode promover nas células.

Os experimentos de validação, realizados em dois genótipos diferentes do HCV (genótipo 2a e genótipo 3), além de conferirem maior solidez aos resultados, evidenciaram que, apesar de se tratar de um mesmo vírus, sua variação genotípica é capaz de afetar substancialmente a expressão de algumas HSPs, como observado para os genes DNAJC5B e HSPA6. Esses dados, apesar de preliminares, podem fornecer informações importantes na compreensão das características intrínsecas ao genótipo 3, como sua maior propensão ao desenvolvimento de esteatose hepática, à resistência à insulina e até mesmo à

resposta diferencial aos medicamento e ocorrência de resistência viral (ABENAVOLI et al., 2014; GANE et al., 2015; KANWAL et al., 2014).

Os resultados de expressão e silenciamento gênico de DNAJC5B apontam para uma atividade antiviral dessa proteína. Entretanto, apesar dos importantes resultados observados, especialmente com relação a sua expressão diferencial para o genótipo 3, essa proteína ainda é pouco estudada pela comunidade científica, dificultando possíveis correlações com a literatura. Alguns trabalhos relatam que tecidos específicos como testículo e cérebro possuem uma maior expressão dessa HSP, provavelmente atuando em vias secretórias (BOAL et al., 2007; GUNDERSEN et al., 2010).

A proteína HSPB8 apresentou dados robustos de expressão sem diferenciação entre os genótipos do HCV, e sua possível atividade antiviral foi demonstrada nos três modelos virais. Além disso, os ensaios de interação proteína-proteína correlacionam a HSPB8 diretamente com a NS4B do vírus. Apesar desses dados serem inéditos na literatura, podemos estabelecer uma correlação com uma outra proteína (HSPB1), da mesma família de chaperonas, que possui atividade antiviral para o vírus da hepatite B (TONG et al., 2013). Além disso, dados ainda não publicados obtidos em nosso laboratório demonstram que a proteína HSBP1 também apresenta uma possível atividade antiviral para o vírus da hepatite C.

Com isso, o presente trabalho demonstra a importância das proteínas de choque térmico, em especial DNAJC5B e HSPB8, não apenas no impacto sobre a replicação do HCV, mas também nos mecanismos de defesa das células infectadas. Estes dados podem, no futuro, auxiliar a compreensão das consequências que a infecção pelo HCV causa nas células, bem como fornecer alternativas para minimizar essas alterações.

## 2 Referências bibliográficas

ABENAVOLI, L. et al. Insulin resistance and liver steatosis in chronic hepatitis C infection genotype 3. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 41, p. 15233-40, Nov 7 2014.

BOAL, F. et al. Cysteine-string protein isoform beta (Cspb $\beta$ ) is targeted to the trans-Golgi network as a non-palmitoylated CSP in clonal beta-cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 2, p. 109-19, Feb 2007.

GANE, E. J. et al. Efficacy of ledipasvir and sofosbuvir, with or without ribavirin, for 12 weeks in patients with HCV genotype 3 or 6 infection. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1454-1461 e1, Nov 2015.

GUNDERSEN, C. B. et al. Cysteine string protein beta is prominently associated with nerve terminals and secretory organelles in mouse brain. **Brain Res**, v. 1332, p. 1-11, May 21 2010.

KANWAL, F. et al. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 98-105, Jul 2014.

KHACHATOORIAN, R.; FRENCH, S. W. Chaperones in hepatitis C virus infection. **World J Hepatol**, v. 8, n. 1, p. 9-35, Jan 08 2016.

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

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

## ***Capítulo IV - Artigos Publicados***

---



CHICAGO JOURNALS



Acupuncture Needles Can Carry Hepatitis C Virus

Author(s): M. A. Lemos Jr, MD; J. B. G. Silva, MD, PhD; A. C. S. Braga, MS; B. M. Carneiro, PhD; P. Rahal, PhD; R. C. M. A. Silva, MD, PhD

Source: *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Vol. 35, No. 10 (October 2014), pp. 1319-1321

Published by: [The University of Chicago Press](#) on behalf of [The Society for Healthcare Epidemiology of America](#)

Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/10.1086/678079>

Accessed: 08/12/2014 14:15

Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of the Terms & Conditions of Use, available at <http://www.jstor.org/page/info/about/policies/terms.jsp>

JSTOR is a not-for-profit service that helps scholars, researchers, and students discover, use, and build upon a wide range of content in a trusted digital archive. We use information technology and tools to increase productivity and facilitate new forms of scholarship. For more information about JSTOR, please contact support@jstor.org.



<http://www.jstor.org>

The University of Chicago Press and The Society for Healthcare Epidemiology of America are collaborating with JSTOR to digitize, preserve and extend access to *Infection Control and Hospital Epidemiology*.

## Caffeine inhibits hepatitis C virus replication *in vitro*

Mariana N. Batista · Bruno M. Carneiro ·  
Ana Cláudia S. Braga · Paula Rahal

Received: 30 October 2013 / Accepted: 28 November 2014 / Published online: 11 December 2014  
© Springer-Verlag Wien 2014

**Abstract** Hepatitis C is considered the major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Conventional treatment is not effective against some hepatitis C virus (HCV) genotypes; therefore, new treatments are needed. Coffee and, more recently, caffeine, have been found to have a beneficial effect in several disorders of the liver, including those manifesting abnormal liver biochemistry, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Caffeine acts directly by delaying fibrosis, thereby improving the function of liver cellular pathways and interfering with pathways used by the HCV replication cycle. In the current study, the direct relationship between caffeine and viral replication was evaluated. The Huh-7.5 cell line was used for transient infections with FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi and to establish a cell line stably expressing SGR-Feo JFH-1. Caffeine efficiently inhibited HCV replication in a dose-dependent manner at non-cytotoxic concentrations and demonstrated an  $IC_{50}$  value of 0.7263 mM after 48 h of incubation. These data demonstrate that caffeine may be an important new agent for anti-HCV therapies due to its efficient inhibition of HCV replication at non-toxic concentrations.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00705-014-2302-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. N. Batista · B. M. Carneiro · A. C. S. Braga · P. Rahal (✉)  
Department of Biology, Institute of Bioscience, Language and Literature and Exact Science, São Paulo State University, IBILCE, UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil  
e-mail: rahalp@yahoo.com.br;  
prahal@ibilce.unesp.br  
B. M. Carneiro  
e-mail: brunocopo@yahoo.com.br

### Introduction

Hepatitis C is a liver infection caused by hepatitis C virus (HCV) [5]. Usually, this infection does not generate an adequate host immune response [13], and it progresses to a chronic infection in approximately 80 % of patients [19]. HCV infection is a global public health problem and has been associated with 350,000 annual deaths related to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [4]. Pegylated interferon alpha (PEG-INF) in association with ribavirin (RBV) has been the standard treatment for patients with chronic HCV infection in the last decade [35]. The new standard treatment includes the protease inhibitors boceprevir and telaprevir in association with PEG-INF and RBV [29]. However, severe side effects are observed, the treatment is costly, and viral resistance has been demonstrated for all classes of directly acting antivirals [17]. Therefore, new treatments are needed.

Coffee and caffeine consumption has been associated with beneficial effects in patients with abnormal liver function, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3, 6, 10]. The daily consumption of approximately 3 cups of coffee [10], which is approximately 408 mg of caffeine [6], may reduce the risk of chronic liver disease progression. Caffeine has also been demonstrated to have an antiproliferative effect on liver cancer cells [28]. Moreover, caffeine consumption may limit liver fibrosis, especially in patients with chronic HCV infection (14 % milder than other fibrosis groups) [24].

It has been suggested that caffeine may interact with cellular pathways to slow the progression of liver diseases. Among these pathways, a decrease in alanine aminotransferase (ALT) [30], alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase (ASP) and an increase in serum albumin have been observed [24]. These studies indicate that



## A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity

Paulo R. S. Sanches<sup>1</sup> · Bruno M. Carneiro<sup>2</sup> · Mariana N. Batista<sup>2</sup> · Ana Cláudia S. Braga<sup>2</sup> · Esteban N. Lorenzón<sup>1</sup> · Paula Rahal<sup>2</sup> · Eduardo Maffud Cilli<sup>1</sup>

Received: 28 January 2015 / Accepted: 30 March 2015 / Published online: 14 April 2015  
© Springer-Verlag Wien 2015

**Abstract** Conjugate compounds constitute a new class of molecules of important biological interest mainly for the treatment of diseases such as cancer. The N-terminus region of cationic peptides has been described as important for their biological activity. The aim of this study was to evaluate the lytic peptide Hecate (FALALKALKKKLKKALKKAL) and the effect of conjugating this macromolecule with gallic acid ( $C_7H_6O_5$ ) in terms of structure, anti-cancer activity, and toxicity. An N-terminus GA-Hecate peptide conjugate was synthesized to provide information regarding the relationship between the amino-terminal region and its charge and the secondary structure and biological activity of the peptide; and the effects of gallic acid on these parameters. Peptide secondary structure was confirmed using circular dichroism (CD). The CD measurements showed that the peptide has a high incidence of  $\alpha$ -helical structures in the presence of SDS and LPC, while GA-Hecate presented lower incidence of  $\alpha$ -helical structures in the same chemical environment. An evaluation of the anti-cancer activity in HeLa cancer cells indicated that both peptides are active, but that coupling gallic acid at the N-terminus decreased the activity of the free peptide. GA-Hecate showed lower activity in non-tumor keratinocyte cells but higher hemolytic activity. Our findings suggest that the N-terminus of Hecate plays an important role in

its activity against cervical cancer by affecting its secondary structure, toxicity, and hemolytic activity. This study highlights the importance of the N-terminus in antitumor activity and could provide an important tool for developing new anti-cancer drugs.

**Keywords** Hecate · Gallic acid · Bioconjugates · Cervical cancer · Hemolytic activity · Secondary structure

### Introduction

Cancer has become a great concern in public health; it is caused by abnormal cells characterized by high metabolism and uncontrollable division. Cervical cancer is one of the most common cancer types in the world, mainly in less-developed regions (Ferlay et al. 2010). Human papilloma virus (HPV), poor genital hygiene, cultural factors, sexual behavior patterns, and smoking are some of the causal associations and etiological risk factors of cervical cancer (Kumar and Bhasker 2014). Although surgery and/or radiotherapy have been used to treat localized cancer, chemotherapy is still the treatment of choice for most cancers. Drugs are usually administered systemically and are therefore subject to variations in absorption, metabolism, and delivery to target tissues that can be patient-specific (Szakács et al. 2006). In addition, tumors could be located in regions of the body not easily accessible to drugs or could be protected by local environments due to increased tissue hydrostatic pressure or altered tumor vasculature (Szakács et al. 2006). Generally, the nature of conventional therapeutics, especially low molecular weight molecules, enables them to penetrate various body compartments and access numerous cell types and sub-cellular organelles (Vilar et al. 2012). However, cancer and non-tumor host

Handling Editor: M. S. Palma.

✉ Eduardo Maffud Cilli  
cilli@iq.unesp.br

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Chemical Technology, Institute of Chemistry, UNESP, Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP CEP 14800-060, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Univ Estadual Paulista, S.J.Rio Preto, SP, Brazil

## RESEARCH ARTICLE

# Evaluation of Canonical siRNA and Dicer Substrate RNA for Inhibition of Hepatitis C Virus Genome Replication – A Comparative Study

Bruno Carneiro<sup>1,2\*</sup>, Ana Cláudia Silva Braga<sup>1</sup>, Mariana Nogueira Batista<sup>1</sup>, Mark Harris<sup>2†</sup>, Paula Rahal<sup>1\*‡</sup>

**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, LS2 9JT, United Kingdom

† These authors contributed equally to this work.

\* [brunocopo@yahoo.com.br](mailto:brunocopo@yahoo.com.br) (BC); [prahal@ibilce.unesp.br](mailto:prahal@ibilce.unesp.br) (PR)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Carneiro B, Braga ACS, Batista MN, Harris M, Rahal P (2015) Evaluation of Canonical siRNA and Dicer Substrate RNA for Inhibition of Hepatitis C Virus Genome Replication – A Comparative Study. PLoS ONE 10(2): e0117742. doi:10.1371/journal.pone.0117742

**Academic Editor:** Naglaa H. Shoukry, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), CANADA

**Received:** March 23, 2014

**Accepted:** January 1, 2015

**Published:** February 23, 2015

**Copyright:** © 2015 Carneiro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by São Paulo Research Foundation ([www.fapesp.br](http://www.fapesp.br)), grant 2009/06534-9 - BC; Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel ([www.capes.gov.br](http://www.capes.gov.br)), grant 5290/11-2 - BC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## 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. The objective of this study was to test the ability of five Dicer substrate siRNAs (DsiRNA) to inhibit HCV replication and to compare these molecules to canonical 21 nt siRNA. DsiRNA molecules were designed to target five distinct regions of the HCV genome – the 5' UTR and the coding regions for NS3, NS4B, NS5A or NS5B. These molecules were transfected into Huh7.5 cells that stably harboured an HCV subgenomic replicon expressing a firefly luciferase/neoR reporter (SGR-Feo-JFH-1) and were also tested on HCVcc-infected cells. All of the DsiRNAs inhibited HCV replication in both the subgenomic system and HCVcc-infected cells. When DsiRNAs were transfected prior to infection with HCVcc, the inhibition levels reached 99.5%. When directly compared, canonical siRNA and DsiRNA exhibited similar potency of virus inhibition. Furthermore, both types of molecules exhibited similar dynamics of inhibition and frequencies of resistant mutants after 21 days of treatment. Thus, DsiRNA molecules are as potent as 21 nt siRNAs for the inhibition of HCV replication and may provide future approaches for HCV therapy if the emergence of resistant mutants can be addressed.

## Introduction

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a worldwide public health problem, a major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and has been considered the leading indication for liver transplantation [1]. Approximately 170 million people are chronically infected with HCV worldwide, and studies in the USA found that deaths caused by HCV infection exceeded those resulting from HIV infection [2].



## Inhibition of hepatitis C virus using siRNA targeted to the virus and Hsp90

Ana Claudia Silva Braga<sup>1</sup> · Bruno Moreira Carneiro<sup>1,2</sup> · Mariana Nogueira Batista<sup>1</sup> · Mônica Mayumi Akinaga<sup>1</sup> · Paula Rahal<sup>1</sup>

Received: 28 July 2016 / Revised: 24 October 2016 / Accepted: 8 November 2016  
© Cell Stress Society International 2016

**Abstract** Hepatitis C (HCV) is a viral disease affecting millions of people worldwide, and persistent HCV infection can lead to progressive liver disease with the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. During treatment for hepatitis C, the occurrence of viral resistance is common. To reduce the occurrence of resistance, new viral treatments should target both viral and cellular factors. Many interactions occur between viral and host proteins during the HCV replication cycle and might be used for the development of new therapies against hepatitis C. Heat shock protein 90 (Hsp90) plays a role in the folding of cellular and viral proteins and also interacts with HCV proteins. In the present study, we knocked down the expression of the Hsp90 gene and inhibited viral replication using siRNA molecules. Reducing the expression of Hsp90 successfully decreased HCV replication. All siRNA molecules specific to the viral genome showed the efficient inhibition of viral replication, particularly siRNA targeted to the 5'UTR region. The combination of siRNAs targeting the viral genome and Hsp90 mRNA also successfully reduced HCV replication and reduced the occurrence of viral resistance. Moreover, these results suggest that an approach based on the combination of cellular and viral

siRNAs can be used as an effective alternative for hepatitis C viral suppression.

**Keywords** Hepatitis C · Hsp90 · RNA interference · siRNA · HCV · Heat shock protein

### Introduction

Hepatitis C is caused by infection of the hepatitis C virus (HCV), and the precise number of individuals infected with HCV worldwide is unknown. However, it has been estimated that between 64 and 103 million people are chronically infected with HCV (Gower et al. 2014). Persistent HCV infection leads to progressive liver disease with the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, potentially accounting for up to 0.5 million deaths annually (Lozano et al. 2012).

HCV is a member of the *Flaviviridae* family and is a relatively small enveloped virus with a positive-sense, single-stranded RNA genome (Giannini and Brechot 2003). The viral RNA encodes a polyprotein, which is cleaved by cellular and viral proteases to create structural (Core, E1, E2, and p7) and non-structural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) (Bartenschlager et al. 2004; Giannini and Brechot 2003). The variability of viral RNA enables the classification of HCV into six genotypes (1 to 6) and several subtypes epidemiologically associated with risk factors and geographical areas (Simmonds 2013).

For many years, a combination of interferon and ribavirin has been used for the treatment of hepatitis C patients, but in addition to the side effects, this treatment displays low efficacy (Chou et al. 2013). Since 2011, direct acting antivirals (DAAs) have been made available for the treatment of chronically infected HCV individuals. These new drugs represented

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12192-016-0747-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Paula Rahal  
prahal@ibilce.unesp.br

<sup>1</sup> Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, SP CEP: 15054-000, Brazil

<sup>2</sup> Institute of Exact and Natural Sciences, Mato Grosso Federal University, Rondonópolis, Brazil



## The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry

Bruno M. Carneiro<sup>a,\*</sup>, Mariana N. Batista<sup>a</sup>, Ana Cláudia S. Braga<sup>a</sup>, Maurício L. Nogueira<sup>b</sup>, Paula Rahal<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Genomic Studies, São Paulo State University - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, FAMERP, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 May 2016

Returned to author for revisions

14 June 2016

Accepted 15 June 2016

#### Keywords:

Zika virus

(–)-Epigallocatechin gallate

Antiviral

Green-tea

### ABSTRACT

During ZIKV the outbreak in Brazil it was observed an increase of almost 20 times the number of reported cases of microcephaly in newborn babies. There is no vaccine or approved drug available for the treatment and prevention of infections by this virus. EGCG, a polyphenol present in green tea has been shown to have an antiviral activity for many viruses. In view of the need for the development of a drug against a Brazilian strain of ZIKV, we assessed the effect of EGCG on ZIKV entry in Vero E6 cells. The drug was capable of inhibiting the virus entry by at least 1-log (> 90%) at higher concentrations (> 100 μM). The pre-treatment of cells with EGCG did not show any effect on virus attachment. This is the first study to demonstrate the effect of EGCG on ZIKV indicating that this drug might be possibility to be used for prevention of Zika virus infections.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The Zika (ZIKV) virus, which causes the Zika fever, was first identified in 1947 in Uganda, in a forest with the same name (Dick et al., 1952). Since its initial identification, sporadic cases were reported in Southeast Asia and sub-Saharan Africa (Hayes, 2009). In 2007, the first outbreak caused by this virus was reported in Micronesia and more recently, in French Polynesia and Easter Island (Cao-Lormeau et al., 2014; Duffy et al., 2009). The first indigenous case of Zika virus in Brazil was confirmed in May of 2015 (Zanluca et al., 2015).

During the outbreak in Brazil it was observed an increase of almost 20 times the number of cases of microcephaly in reported newborn babies. Health officials believe there may be a link between the virus and this clinical condition. So far, no other *Flavivirus* was shown to have teratogenic capacity (Fauci and Morens, 2016). Nonetheless, two research groups have recently and independently demonstrated the presence of the virus in both brain tissue and amniotic fluid of aborted fetuses, strengthening the virus's link to cases of microcephaly (Calvet et al., 2016; Mlakar et al., 2016). Finally, Rasmussen et al. (2016) demonstrated a strong causal relationship between ZIKV and microcephaly and associated it to brain anomalies in fetuses and infants. Despite the efforts of many researchers, up to this date there is no vaccine available for the treatment and prevention of infections caused by

this virus. Besides, no drug with antiviral activity against this virus has been authorized. Such measures could greatly reduce cases of neurological damage in fetuses.

The (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) (Fig. 1), a polyphenol present in large quantities in green tea has been shown to have an intense antiviral activity for many viruses, including the human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus (HSV), influenza virus (FLU) and hepatitis C virus (HCV) (Calland et al., 2012; Isaacs et al., 2008; Nance et al., 2009; Song et al., 2005). These studies demonstrated that EGCG mainly acts by inhibiting the entry of the virus into the host cell. Furthermore, it has been shown that the administration of this drug is safe for healthy individuals (Chow et al., 2003). Considering the fact that EGCG has an antiviral activity against different viruses including HCV, a virus belonging to the same family of ZIKV, and taking in account the need for the development of a drug against ZIKV, we assessed the effect of EGCG on ZIKV entry in Vero E6 cells.

### 2. Methods

#### 2.1. Virus preparation

It was used a strain of Zika virus (ZIKV<sup>BR</sup>) isolated from a febrile case in the state of Paraíba (Faria et al., 2016), northeastern Brazil, courtesy of Dr. Pedro Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas, Brazil. A sample of this virus was inoculated in *Aedes albopictus* cells clone C6/36 and incubated for 10–12 days until onset of cytopathic effects. Subsequently a freeze-thaw cycle was done, the

\* Corresponding author.

E-mail address: [brunocopo@yahoo.com.br](mailto:brunocopo@yahoo.com.br) (B.M. Carneiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.012>

0042-6822/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 30 / 08 / 2017

Ana Claudia Silva Braga

Assinatura do autor