

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

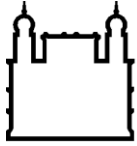
# **Investigação do Silenciamento Gênico Produzido por Pequenos RNAs de Interferência no Ciclo Replicativo do Vírus da Hepatite A**

**Juliana Freitas Lopes**

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

Setembro/2010



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Juliana Freitas Lopes**

# **Investigação do Silenciamento Gênico Produzido por Pequenos RNAs de Interferência no Ciclo Replicativo do Vírus da Hepatite A**

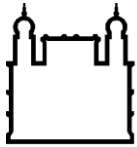
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos necessários para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

**Orientadores:** Prof. Dr. Christian Maurice Gabriel Niel

Prof. Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula

**RIO DE JANEIRO**

Setembro/2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Juliana Freitas Lopes**

**Investigação do Silenciamento Gênico  
Produzido por Pequenos RNAs de Interferência  
no Ciclo Replicativo do Vírus da Hepatite A**

**Orientadores:** Prof. Dr. Christian Maurice Gabriel Niel  
Prof. Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula

**Aprovada em: 20/09/2010**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>a</sup> LIVIA MELO VILLAR (PRESIDENTE)  
FIOCRUZ/IOC

---

Prof. Dr. TIAGO CAMPOS PEREIRA (MEMBRO)  
USP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELISABETH LAMPE (MEMBRO)  
FIOCRUZ/IOC

**SUPLENTE**

---

Prof. Dr<sup>a</sup> MARCIA TEREZINHA BARONI DE MORAES E SOUZA  
FIOCRUZ/IOC

**REVISOR**

---

Prof. Dr<sup>o</sup> THIAGO MORENO LOPES E SOUZA  
FIOCRUZ/IOC

# Dedicatória

À minha mãe.

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por nunca se cansar de me dar as melhores pistas para que eu consiga traçar meu caminho.

À minha querida mãe, por todos os sacrifícios feitos, todo apoio, compreensão e amor. Por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Por nunca esmorecer a luta que sempre foi tão grande. Por ser minha mãe guerreira. A mim cabe a frase, “A melhor mãe do mundo é a minha!”.

À “menina mais linda desse mundo”, minha irmãzinha Clarisse pela alegria que traz a nossa família.

Aos meus familiares, pelo apoio incondicional sempre, mesmo que muitas vezes distante. Muito Obrigada pela torcida!

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Christian Maurice Gabriel Niel e a Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula, pela confiança depositada em mim para realização deste projeto, orientação e amizade.

À Equipe de suporte da Applied Biosystems do Brasil, especialmente a especialista Carolina Rodrigues Almeida, pelos inúmeros esclarecimentos realizados, pela paciência e dedicação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade de participar do programa, pela enorme ajuda proveniente dos seminários discentes e aos funcionários pela boa vontade e disponibilidade.

Aos professores da PGBCM, por compartilharem seus conhecimentos comigo e contribuírem fortemente para minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida durante esses dois anos.

Àos membros da banca examinadora por aceitar me argüir.

Ao Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza e a aluna Cristiane Maia Alves do Laboratório de Vírus respiratórios e do sarampo do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ pela enorme ajuda durante a reta final deste trabalho.

À todos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDTV) em Virologia, que literalmente fizeram parte deste projeto, sempre com uma dica, um conselho, uma ajuda... São eles: Alexandre Santos, Aline Moraes, Anna Carolina Mendes, Daniella Sampaio, Débora Lopes, Lilian Carvalho, Luciane Almeida, Renata Tourinho, Tamara Fogel e Tatiana Prado.

Ao Chefe do LDTV, Dr. Marcelo Alves Pinto pelo suporte e auxílio na confecção deste projeto.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Lamarca Vitral, minha primeira orientadora, pela simpatia de sempre.

À querida Amanda Perse, companheira neste projeto e com quem pude contar muitíssimo durante esses dois anos. Obrigada, Amandinha!

À técnica e “mão na roda” Paula Borba, por estar sempre presente e pronta a ajudar. Sua ajuda foi muito importante!

Ao Laboratório de Virologia Comparada pela melhor companhia de corredor. Especialmente aos amigos Dr. José Paulo Leite, Dr. Eduardo Volotão, Ana Pinto, Chica, Alexandre Fialho, Túlio Fumian, Fernando Torte, Mathias Motero, Ana Carolina Ganime, Ludmila Rocha, Maru Galeano, Juliana Andrade e Carmen Baur (benditas caronas).

Aos amigos de faculdade, Cássia Soares, Tatiane Sicca e Filipi Magalhães pelas inúmeras conversas no Plaza shopping Niterói, pelo apoio e torcida.

Meu super agradecimento ao meu namorado e companheiro de trabalho Gentil Vasconcelos, pelo suporte tanto emocional quanto profissional. Nunca imaginei que você seria tão importante. Obrigada!

Às minhas lindas e queridíssimas amigas Paula Motta e Paula Bothomé, pessoas especialíssimas que Deus colocou no meu caminho. Não tenho palavras para expressar o quão vocês são essenciais na minha vida.

“O sucesso não é o final e o fracasso não é fatal:  
o que conta é a coragem para seguir em frente”

Mestre Arievlis

## Resumo

O vírus da hepatite A (HAV) possui genoma RNA de fita simples de 7,5 Kb e polaridade positiva. Este vírus pertence à família *Picornaviridae*, gênero Hepatovirus, com propriedades biológicas únicas, em particular, o crescimento lento em cultura celular com ausência de efeito citopático. O HAV causa uma infecção autolimitada normalmente com pouco ou nenhum sintoma em pacientes jovens (abaixo de 5 anos). Já em pacientes adultos, sintomas graves podem aparecer com 1% dos casos podendo evoluir para uma hepatite fulminante. A inibição da replicação viral pode retardar a infecção pelo vírus prevenindo uma hepatite fulminante. Pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que agem com base na degradação seqüência-específica do genoma, pode constituir uma nova estratégia para a inibição específica de vários tipos de vírus. A interferência por siRNA é um processo onde fitas duplas de RNA (dsRNA) são capazes de silenciar as funções específicas de um gene alvo. A via de siRNA pode ser induzida em células por transfecção de oligômeros sintéticos de 21-23 nucleotídeos. O objetivo deste estudo foi avaliar o silenciamento produzido por três seqüências específicas de siRNAs, uma para região 2C (helicase), e duas para 3D (protease) do genoma do HAV. Vinte e quatro horas antes da transfecção, células FRHK-4 foram cultivadas em placas de 24 poços, com meio 199 e densidade de  $10^5$  células por poço. Em seguida, as células foram transfectadas por 4 horas com cada siRNA e suas combinações. Após isto, as células foram infectadas com o HAV ( $10^5$  cópias/ml) e cultivadas por cinco dias consecutivos à 37°C. Seqüências não-específicas foram utilizadas como controle negativo. O RNA total foi extraído e a análise foi realizada por RT-PCR, sendo o silenciamento confirmado por imunofluorescência. Todas as seqüências mostraram-se com capacidade inibitória. A melhor taxa de silenciamento ocorreu no segundo dia com as três seqüências em conjunto, atingindo 85% de inibição da replicação viral. Tal resultado foi confirmado pela diminuição da intensidade da fluorescência para o HAV. As combinações foram mais eficazes do que cada seqüência utilizada isoladamente. Os siRNAs foram eficazes na diminuição da expressão da helicase e protease do HAV.

Palavras Chave: Hepatite A, Silenciamento Gênico e RNA de interferência.



## Abstract

Hepatitis A virus (HAV) has a single-stranded RNA genome of 7.5 kb with positive polarity. This virus belongs to the *Picornaviridae* family, genus Hepatovirus with unique biological properties, in particular, slow growth in cell culture without cytopathic effect. HAV causes a self-limiting liver infection with usually mild or no symptoms in young patients. Whereas adult patients might suffer from severe symptoms and 1% of cases can evolve to fulminant hepatitis. Inhibition of viral replication can improve viral infection and thus prevent fulminant failure. Small interference RNA (siRNA) based on specific sequence may present a novel and specific approach strategy for inhibition of various types of virus. RNA interference is a process by which double-stranded (dsRNA) is able to silence specific gene functions. The siRNA pathway can be induced in mammalian cells by transfection of short synthetic sequence-specific oligomers with 21-23 nucleotides. The aim of this study was to evaluate the silencing produced by three specific sequences of siRNAs, one for region 2C (helicase), and two for 3D (protease) of the HAV. Twenty-four hours before transfection, FRHK-4 cells were cultivated in 24-well plate in 199 medium with density of  $10^5$  cells per well. After that, cells were transfected for 4 hours with each siRNA and its combinations following by infection with HAV ( $10^5$  copies/ml) and grown for five consecutive days. Non-specific sequences were used as negative control. The total RNA was extracted (with commercial kit) and analysis was performed by RT-PCR and silencing was confirmed by immunofluorescence. All sequences showed inhibitory capacity. The best silencing occurred in the second day using the three sequences together reaching 85% of inhibition viral replication. This result was confirmed with the decrease in fluorescence intensity for HAV. The combination of the sequences was more effective than the sequences used alone. The siRNAs could knockdown the expression of helicase and protease of HAV.

Key Words: Hepatitis A, Gene silencing and Interference RNA.

# Sumário

Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução .....	1
1.1. RNAs de Interferência.....	1
1.1.1. Estado da Arte .....	1
1.1.2. Conceito e Classificação.....	2
1.1.3. Mecanismo de Ação .....	5
1.1.4. Princípios da utilização de siRNAs.....	9
1.1.5. Aplicações de siRNAs .....	12
1.1.6. Limitações na utilização de siRNAs .....	16
1.2. Vírus da hepatite A .....	19
1.2.1. Histórico .....	19
1.2.2. A partícula viral.....	20
1.2.3. Organização genômica e Proteínas do HAV.....	20
1.2.4. Replicação viral.....	22
1.2.5. Diversidade genética do HAV.....	23
1.2.6. Sorotipo e antigenicidade .....	24
1.2.7. Características Clínicas.....	25
1.2.8. Patogenia.....	26
1.2.9. Diagnóstico .....	28
1.2.10. Epidemiologia .....	30
1.2.11. Prevenção.....	32
2. Justificativa .....	33
3. Objetivos.....	34
3.1. Objetivo Geral.....	34
3.2. Objetivos Específicos .....	34

4.	Material e Métodos.....	35
4.1.	Cultura Celular.....	35
4.2.	Sequências de siRNA.....	35
4.3.	Preparo dos oligonucleotídeos específicos (siRNAs).....	36
4.4.	Produção viral.....	36
4.5.	Transfecção e Ensaio em Placa .....	37
4.6.	Extração do RNA.....	38
4.7.	Monitoramento da eficiência de transfecção por intensidade de fluorescência .....	39
4.8.	Medição da viabilidade celular por (sódio 3´-[1-(fenilaminocarbonil)- 3,4-tetrazólio]) (XTT) .....	40
4.9.	Imunofluorescência .....	41
4.10.	PCR em tempo real.....	42
4.10.1.	Quantificação Absoluta.....	43
4.10.2.	Quantificação Relativa.....	44
4.11.	Análise estatística .....	45
5.	Resultados .....	46
5.1.	Viabilidade Celular.....	46
5.2.	Curva Dose-Dependente.....	47
5.3.	Monitoramento da eficiência de transfecção por intensidade de fluorescência .....	48
5.4.	Silenciamento.....	50
5.5.	Imunofluorescência para HAV .....	57
6.	Discussão .....	60
7.	Conclusões.....	66
8.	Referências Bibliográficas.....	67

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Principais classes de pequenos RNAs não codificadores com ação regulatória (Chu <i>et al.</i> , 2007 modificado). .....	4
Tabela 4.1: Sequências nucleotídicas dos siRNA específicos utilizados descritas por Kanda <i>et al.</i> , 2004 .....	36
Tabela 4.2: Volume dos reagentes do kit EZ CORE reagents.....	43
Tabela 4.3: Média dos CTs das amostras transfectadas e não transfectadas para o controle endógeno utilizado. ....	45
Tabela 5.1: Média da Quantificação Absoluta das concentrações utilizadas para estabelecer a curva-dose dependente após 48 horas de transfecção.....	47

## Lista de Figuras

Figura 1.1: Em A, fenótipo de Petúnias parentais e em B, fenótipos encontrados por Napoli e colaboradores como resultado o fenômeno de co-supressão (Napoli <i>et al.</i> , 1990). ...1	1
Figura 1.2: Diversas fontes de geração de siRNAs e o mecanismo de ação mediado por RISC (Carthew <i>et al.</i> , 2009 modificado). ..... 7	7
Figura 1.3: Biogênese de miRNAs (Li Y <i>et al.</i> , 2010 modificado). ..... 9	9
Figura 1.4: Múltiplos possíveis alvos envolvidos no silenciamento por siRNAs durante o ciclo replicativo viral (Colbère-Garapin <i>et al.</i> , 2005 modificado)..... 15	15
Figura 1.5 : Microscopia Eletrônica do HAV (fonte: CDC, 2009 <a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a> ). ....20	20
Figura 1.7: Fases clínicas e marcadores séricos da infecção. .... 26	26
Figura 1.8: Distribuição geográfica da infecção pelo HAV. (Fonte: Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E - an overview, CDC, 2006) ..... 32	32
Figura 4.1: Curva Padrão do HAV para análise de Quantificação Absoluta. .... 44	44
Figura 5.1: Porcentagem de células que permaneceram viáveis cinco dias após o processo de transfecção (valor médio) ..... 46	46
Figura 5.2: Curva-dose dependente das sequências de siRNAs utilizadas 48 horas pós-transfecção. .... 48	48
Figura 5.3: Em A, célula não transfectada (controle). Em B, célula transfectada com <i>Silencer<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> GAPDH siRNA</i> e em C, célula transfectada com <i>Silencer<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup>Labeled Negative Control #1 siRNA</i> 4 horas após a transfecção (Aumento de 63X)..... 49	49
Figura 5.6: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 1° dia pós-infecção .. 51	51
Figura 5.7 : Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 2° dia pós-infecção. 52	52
Figura 5.8: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 3° dia pós-infecção .. 53	53
Figura 5.9: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 4° dia pós-infecção .. 54	54
Figura 5.10: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 5° dia pós-infecção 55	55
Figura 5.11: Porcentagem de inibição de todas as sequências nos 5 dias analisados. 56	56
Figura 5.12: Em A, células não transfectadas (controle positivo), em B, células transfectadas com a sequência controle negativa RNA#1, em C, D e E células transfectadas com a sequência 2C1,3D1 e 3D2 respectivamente. Em F, G, H, I, células transfectadas com as combinações 2C1+3D1, 2C1+3D2, 3D1+3D2 e 2C1+3D1+3D2, respectivamente (Aumento 63X)..... 59	59

## Lista de Siglas e Abreviaturas

**µg** — Microgramas  
**µl** — Microlitro  
**µM** — Micromolar  
**ACMV** — *African cassava mosaic vírus*  
**Ago 1-4** — Proteínas Argonautas classes 1 a 4  
**ALT** — Alanina aminotransferase  
**Anti-HAV** — Anticorpo contra HAV  
**AW1** — *Washer buffer 1*  
**BSA** — Albumina Bovina  
**CAP** — Sete-metil-guanosina trifosfato  
**CBV 3** — Coxsackievirus B3  
**CDC** — *Centers for Disease Control*  
**cm<sup>2</sup>** — Centímetros quadrados  
**CO<sub>2</sub>** — dióxido de carbon  
**COS-7** — Células de rim de macaco verde africano-SV40  
**C<sub>T</sub>** — *Threshold cycle*  
**D.O.** — Densidade ótica  
**DAPI** — 4'6-diamidino-2-fenilindole  
**dATP** — Deoxiadenosina trifosfato  
**DCR** — Enzima DICER  
**dCTP** — Deoxicitosina trifosfato  
**dGTP** — Deoxiguanosina trifosfato  
**DNA** — Ácido desoxirribonucléico  
**dsRNA** — Dupla fita de RNA  
**dUTP** — Deoxiuridina trifosfato  
**EDTA** — Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**ELISA** — Ensaio Imunoenzimático  
**endo-siRNA** — *Small interfering RNAs* endógenos  
**EXP5** — Exportina 5  
**FRhK-4** — Células de rim de macacos *Rhesus*  
**GAPDH** — Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
**h** — Horas  
**HAV** — Vírus da hepatite A  
**HAV-RNA** — RNA viral do vírus da hepatite A  
**HBcAg** — Antígeno de superfície “c” do vírus da hepatite B  
**HBsAg** — Antígeno de superfície “s” do vírus da hepatite B  
**HBV** — Vírus da hepatite B  
**HCV** — Vírus da hepatite C  
**HDV** — Vírus da hepatite D  
**HEV** — Vírus da hepatite E  
**HF** — Hepatite Fulminante  
**HIV** — Vírus da imunodeficiência humana  
**IgA** — Imunoglobulina A  
**IgG** — Imunoglobulina G  
**IgM** — Imunoglobulina M  
**IRES** — Sítio interno de ligação ribossomal (IRES)  
**Kb** — Kilobase  
**Kcl** — Cloreto de potássio  
**Log** — Logaritmo

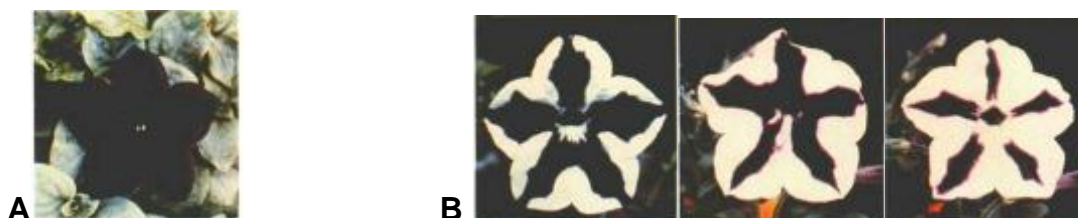
**mg** — Miligrama  
**mim** — Minutos  
**miRNAs** — Micro RNAs  
**ml** — Mililitro  
**mM** — Milimolar  
**NaCl** — Cloreto de sódio  
**NaOH** — Hidróxido de sódio  
**NC** — Não codificante  
**nm** — Nanômetro  
**nt** — Nucleotídeos  
**ODNs** — Oligonucleotídeos antisense  
**OMS** — Organização Mundial de Saúde  
**ORF** — Região aberta de leitura  
**pb** — Pares de bases  
**PBS** — Tampão fosfato salino  
**PCR** — Reação em cadeia da polimerase  
**PEG** — Polietilenoglicol  
**pH** — Potencial hidrogeniônico  
**piRNAs** — *piwi-interaction* RNAs  
**PKR** — *Protein kinase R*  
**PMMoV** — *Pepper mild mottle vírus*  
**Poli-A** — Poliadenilato  
**PPV** — *Plum pox virus*  
**PTGS** — Silenciamento gênico pós-transcricional  
**RdRP** — RNA polimerase RNA dependente  
**RFLP** — Polimorfismo de tamanhos gerados por enzimas de restrição  
**RISC** — *RNA-induced silencing complex*  
**RLT** — Tampão de lise  
**RNA** — Ácido Ribonucléico  
**RNAi** — RNA de interferência  
**RNAm** — RNA mensageiro  
**RNase** — Ribonuclease  
**RPE** — Tampão de lavagem E  
**RQ** — Quantificação Relativa  
**RSV** — Vírus sincicial respiratório  
**RT-PCR** — Transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase  
**SARS-CoV** — Síndrome respiratória aguda severa por coronavírus  
**SFP** — Soro Fetal Bovino  
**siRNAs** — *small interfering* RNAs  
**sRNA** — Simples fita de RNA  
**SSCP** — Polimorfismo conformacional da fita única  
**TEV** — *Tobacco etch vírus*  
**TNF $\alpha$**  — *Tumor necrosis factor-alpha*  
**TRBP** — *Trans-activator RNA (tar)-binding protein*  
**UNG** — Uracil N-glicosilase  
**VIGS** — *Virus-induced gene silencing*  
**WHO** — *World Health Organization*  
**XTT** — Sódio 3'-[1-(fenilaminocarbonil) - 3, 4- tetrazólio]

# 1. Introdução

## 1.1. RNAs de Interferência

### 1.1.1. Estado da Arte

As primeiras evidências registradas da ação de interferência por RNA (RNAi), datam de 1983 com a observação de eventuais fenômenos de silenciamento gênico em *Aspergillus flavus* a partir da ação de RNAs de dupla fita (dsRNA) (Schmidt *et al.*, 1983; Schmidt, 2004). Entretanto, o trabalho reconhecido atualmente como a primeira observação da ação de RNAi, foi o liderado por Napoli em 1990, apesar de Van der Krol e colaboradores terem publicado resultados semelhantes na mesma época (Van der Krol *et al.*, 1990). No primeiro, o objetivo era aumentar a expressão do gene responsável pela produção de antocianinas (proteínas relacionadas com a pigmentação púrpura em petúnias), a partir da inserção de cópias adicionais de homólogos deste gene. Inesperadamente, a expressão do gene endógeno foi parcialmente ou totalmente bloqueada com esta ação, dando origem a petúnias variegadas ou totalmente brancas. Tal fenômeno foi denominado na época de “*co-supressão*” (Figura 1.1).



**Figura 1.1:** Em A, fenótipo de Petúnias parentais e em B, fenótipos encontrados por Napoli e colaboradores como resultado o fenômeno de co-supressão (Napoli *et al.*, 1990).

Posteriormente, o mesmo fenômeno foi evidenciado na espécie de fungo *Neurospora crassa*, no qual a inserção de cópias ao gene *al-1*, relacionado a produção de carotenóides, diminuiu a expressão do seu correspondente endógeno. Assim, colônias brancas foram geradas, enquanto o esperado seriam colônias laranjas. Por ausência de hipóteses que explicassem, até aquele momento, ambos os fenômenos observados, no fungo, deu-se o nome de “*quelling*” (Romano *et al.*, 1992; Cogoni *et al.*, 1996).



Em 1995, Sue Guo e colaboradores, buscando analisar o gene *par-1* em *Caenorhabditis elegans* através de RNA *antisense*, relataram que tanto o RNA *antisense* como o *sense* (controle) levaram ao silenciamento do gene em estudo (Guo *et al.*, 1995). Este trabalho provavelmente inspirou a descoberta do processo de RNAi, publicado três anos depois.

Finalmente, o termo “*Interferência por RNA*” foi primeiramente utilizado no trabalho de Andrew Z. Fire, Craig C. Mello e colaboradores, publicado na revista científica *Nature* em 1998. Buscando silenciar diversos genes no nematóide *C. elegans*, este grupo utilizou RNAs *sense* e *antisense* separadamente e duplas fita de RNA (dsRNA), demonstrando que dsRNA tinha uma ação supressora mais potente e específica em detrimento da administração das fitas isoladas. Assim ficou claro a existência de um processo de regulação gênica mediado por RNA, até então não caracterizado. O estudo rendeu a Andrew Z. Fire e Craig C. Mello o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006.

O RNAi então foi reconhecido como um mecanismo conservado de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), envolvido no sistema de defesa de certos organismos. Desta maneira, RNAs estranhos ao transcriptoma da célula seriam reconhecidos como sinais de perigo ou alerta, sendo identificados e inabilitados (Agrawal *et al.*, 2003).

A partir de então, iniciaram-se os estudos para a elucidação dos aspectos referentes a interferência mediada por RNA, principalmente com relação a biologia celular, molecular e evolutiva envolvida no processo de silenciamento gênico.

### **1.1.2. Conceito e Classificação**

Atualmente, existem diversos trabalhos buscando a caracterização dos aspectos moleculares envolvidos no mecanismo de ação dos siRNAs. Conceitualmente, RNAi pode ser referido como um mecanismo (Li J *et al.*, 2010; Bhuyan *et al.*, 2004; Haasnoot *et al.*, 2007) um processo (Stram *et al.*, 2006; Zhe *et al.*, 2008) ou até mesmo como uma técnica (Aigner, 2006; Lee Y *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004; Rothe *et al.*, 2009).

Existem diversas classes de pequenos RNAs que não codificam proteínas. Os principais são; siRNAs (*small interfering RNAs*), miRNAs (*microRNAs*) e piRNAs (*piwi-interaction RNAs*) (Carthew *et al.*, 2009). Todas as classes podem influenciar

diferentes aspectos do funcionamento genômico em eucariotos, incluindo, formação de heterocromatina (Lippman *et al.*, 2004), repressão e degradação do RNA mensageiro (RNAm) (Tomari *et al.*, 2005), tradução (Pillai *et al.*, 2005), transcrição (Taft *et al.*, 2009), proliferação celular e apoptose (Brennecke *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003) e desenvolvimento e manutenção de células germinativas (Forstemann *et al.*, 2005; Lucchetta *et al.*, 2009; Klattenhoff *et al.*, 2008) (Tabela 1.1).

As moléculas de pequenos RNAs com ação de interferência (siRNAs) são caracterizadas por terem aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos (nt) que agem regulando a expressão gênica ao nível pós-transcricional de forma sequência-específica (Elbashir *et al.*, 2001a).

Os miRNAs, foram descritos inicialmente atuando na regulação de genes endógenos envolvidos no controle do desenvolvimento temporal em *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993). Estruturalmente, são caracterizados por serem RNAs de dupla fita (dsRNAs) de aproximadamente 19 a 25 nt, originados a partir de longas fitas de dsRNAs (acima de 100 pares de bases - pb) (Tomari *et al.*, 2005). Sua função está relacionada a repressão traducional e degradação do RNAm alvo (Tomari *et al.*, 2005).

Os piRNAs ainda não possuem sua biogênese e mecanismos bem elucidados até o momento (Carthew *et al.*, 2009), contudo, sabe-se que representam uma classe com aspectos distintos dos miRNAs e siRNAs. Se comparado com estes, a estrutura dos piRNAs é relativamente maior, possuindo de 20 a 30 nt de tamanho, com precursores de RNAs de fita simples (ssRNAs) (Klattenhoff *et al.*, 2008). Sua função está associada principalmente com a regulação gênica responsável pelo desenvolvimento de células germinativas (Carmell *et al.*, 2007). Além disso, estudos já sugerem uma possível participação de piRNAs na regulação da expressão gênica em células somáticas (Grimaud *et al.*, 2006; Pal-Bhadra *et al.*, 2002; Pal-Bhadra *et al.*, 2004) e em mecanismos relacionados a aprendizagem e memória em *Drosophila melanogaster* (Ashraf *et al.*, 2006).

**Tabela 1.1: Principais classes de pequenos RNAs não codificadores com ação regulatória (Chu *et al.*, 2007 modificado).**

	<b>Tamanho em nucleotídeos</b>	<b>Origem</b>	<b>Função primordialmente associada</b>
<b>Micro RNAs (miRNAs)</b>	19-25	Endógena a partir de dsRNAs	Repressão da Tradução
<b>RNAs de interferência (siRNAs)</b>	21-23	Endógena e Exógena a partir de dsRNAs	Clivagem do RNA mensageiro
<b><i>Interação-piwi</i> RNAs (piRNAs)</b>	26-31	Endógena a partir de ssRNAs	Controle no desenvolvimento germinativo

A medida que novos estudos são feitos, as fronteiras que diferenciam as diversas classes de pequenos RNAs se tornam cada vez mais teóricas, principalmente entre miRNAs e siRNAs. Tais classes possuem alguns aspectos de biogênese semelhantes, e em muitas vezes, as formas de ações e funções se sobrepõem, todavia, algumas diferenças persistem (Carthew *et al.*, 2009).

Inicialmente, miRNAs e siRNAs pareciam distinguir em dois aspectos principais. Primeiro, miRNAs tem primordialmente sua origem de forma endógena, sendo sintetizados a partir do genoma do próprio organismo como uma estratégia de regulação de genes endógenos (Tomari *et al.*, 2005), enquanto que siRNAs seriam formas exógenas, derivados de genomas virais, transposons e elementos genéticos móveis, servindo como uma estratégia de proteção do organismo a invasores (Mello *et al.*, 2004). Porém, estudos já revelaram uma série de siRNAs de origem endógena (endo-siRNAs) com funções de regulação gênica características de miRNAs (Chung *et al.*, 2008; Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2008a; Okamura *et al.*, 2008b; Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2006).

O segundo aspecto é que miRNAs parecem ser processados a partir de dsRNAs com caráter de complementaridade incompleto para com o RNAm alvo, enquanto que siRNAs teriam complementaridade completa, dando a estes mais especificidade com relação aos miRNAs (Tomari *et al.*, 2005).

### 1.1.3. Mecanismo de Ação

Diversas categorias de transcritos podem servir de fonte de dsRNAs para a geração de siRNAs (Carthew *et al.*, 2009) (Figura 1.2). Inicialmente, dsRNAs presentes no citoplasma, são clivados por uma ribonuclease (RNase) de classe III denominada DICER (DCR) (Bernstein *et al.*, 2001) que é capaz de reconhecer duplas fitas de RNA através de uma proteína ligadora de RNA, TRBP (*trans-activator RNA (tar)-binding protein*) (Chendrimada *et al.*, 2005). Tal clivagem gera RNAs de interferência de aproximadamente 21 a 23 nt, caracterizados por um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos não pareados na extremidade 3' hidroxil terminal (Elbashir *et al.*, 2001a).

Alguns organismos, incluindo mamíferos e nematóides, possuem apenas uma única DICER, que parece atuar tanto na biogênese de siRNAs quanto de miRNAs. (Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001; Provost *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 2003). Entretanto, múltiplas proteínas DICER são encontradas em outros organismos, tais como *D. melanogaster* que possuem duas (DCR1 e DCR2) (Lee YS *et al.*, 2004) e *Arabidopsis thaliana* que possuem quatro DICERs (DCR1 a DCR4) (Park *et al.* 2002; Reinhart *et al.* 2002; Schauer *et al.* 2002). De forma geral, organismos com múltiplas DICERs têm funções diferentes para cada uma delas, por exemplo, em *D. melanogaster*, a DCR-1 está relacionada com a geração de miRNAs, enquanto que a DCR-2 com a geração de siRNAs (Lee YS *et al.*, 2004).

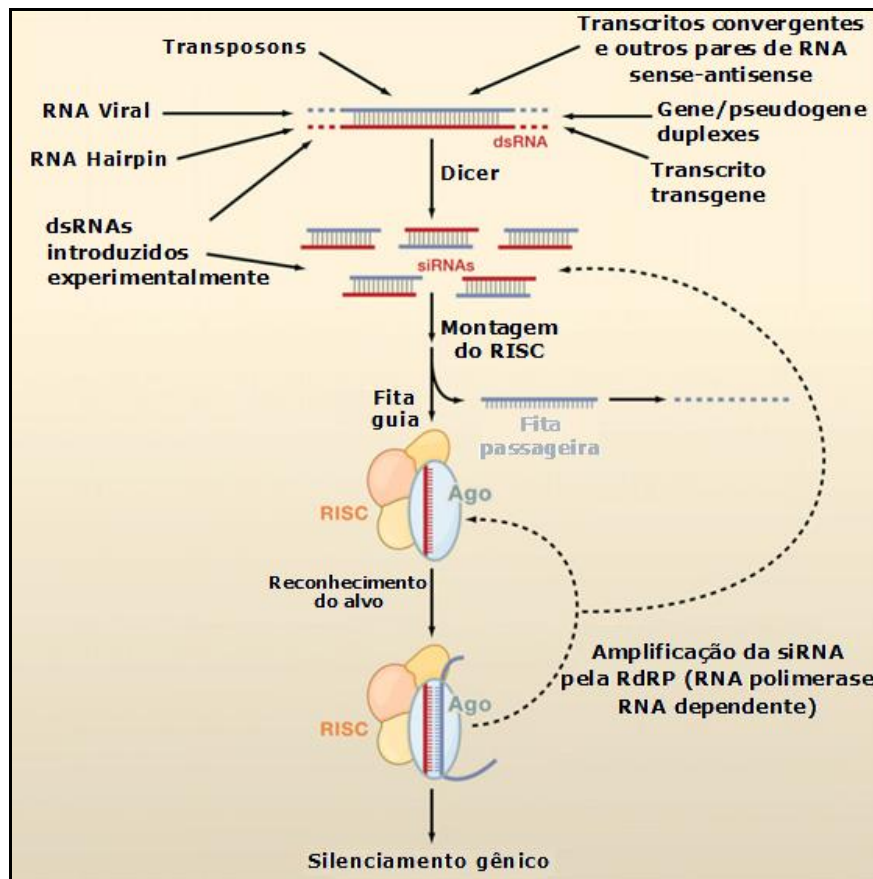
Após a clivagem, a proteína DICER/TRBP irá se associar com outra classe de proteínas denominada Argonautas (Ago) ou *slicer*, sendo esta a principal proteína com atividade catalítica envolvida no processo de silenciamento mediado por RNA (Liu *et al.*, 2004).

As argonautas são consideradas uma super-família de proteínas, altamente conservadas, presentes em todos os organismos com ações regulatórias mediadas por pequenos RNAs (Carmell *et al.*, 2002). Estas são divididas em três subgrupos, o subgrupo *Piwi*, relacionado a ação dos piRNAs, o subgrupo *Ago*, relacionado a ação de miRNAs e siRNAs (Peters *et al.*, 2007) e um terceiro subgrupo descrito somente para nematóides (Yigit *et al.*, 2006). Em humanos, foram identificadas quatro

proteínas argonautas do subgrupo *Ago* (*Ago1-Ago4*) (Sasaki *et al.*, 2003), entretanto somente a *Ago2* apresenta uma atividade catalítica (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004).

O trímero, DICER/TRBP/*Ago2* pode então reconhecer estruturas de siRNAs, formando o complexo de silenciamento mediado por RNA (*RNA-induced silencing complex-RISC*) (Hammond *et al.*, 2000). A proteína TRBP parece ser responsável pelo reconhecimento das fitas. Em *D. melanogaster*, a proteína correspondente a TRBP, denominada R2D2 (Liu *et al.*, 2003), reconhece através da diferença de estabilidade termodinâmica das extremidades do siRNA, ligando-se a extremidade 5' mais estável (Tomari *et al.*, 2004). Após a etapa de reconhecimento, a fita antisense (ou fita guia) do siRNA é acoplada ao complexo, sendo a fita sense (fita passageira) descartada pela ação da proteína *Ago 2* e posteriormente degradada. Assim, o complexo RISC se torna ativo para a ação catalítica (MacRae *et al.*, 2008).

A fita guia então, direciona o RISC para o RNAm alvo a ser degradado (Leuschner *et al.*, 2006). Esta degradação é dirigida pela proteína *Ago2* (Matranga *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005), que realiza clivagem entre os nucleotídeos alvo e as bases 10 e 11 da fita guia (contados a partir da extremidade 5') (Elbashir *et al.*, 2001a) que em seguida cliva o RNAm alvo, gerando grupos 3'-hidroxila e 5'-fosfato (Martinez *et al.*, 2004). A fita guia permanece intacta e permite que RISC silencie pelo menos nove RNAs antes de deixar o complexo (Hutvagner *et al.*, 2002). Após todo o processo de clivagem, a fita guia se dissocia do complexo RISC, liberando-o para a degradação de novos alvos (Rana *et al.*, 2007) (Figura 1.2).



**Figura 1.2: Diversas fontes de geração de siRNAs e o mecanismo de ação mediado por RISC (Carthew *et al.*, 2009 modificado).**

Os fragmentos 5' (contendo CAP – sete-metil-guanosina trifosfato) e o fragmento 3' (contendo cauda poli-A), são então atacados por exonucleases celulares, o primeiro é degradado pelo exossomo (Orban *et al.*, 2005) e/ou uma exoribonuclease com atividade 3'-5' (Glazov *et al.*, 2003) ao passo que o segundo é processado por uma exoribonuclease com atividade 5'-3' (Souret *et al.*, 2004). Esse processo garante que os dois fragmentos não sejam traduzidos, o que poderia gerar proteínas truncadas e possivelmente citotóxicas.

A ação de siRNAs/RISC, eventualmente, podem não ter uma atividade catalítica efetiva, mesmo com o perfeito pareamento das bases. Isto leva a um silenciamento pós-transcricional de forma parcialmente específica, semelhante ao silenciamento realizado pelos miRNAs. Neste caso, a ação de ambos parece ser virtualmente indistinguível (Tomari *et al.*, 2005).

Uma das principais características da ação de siRNAs é a potência, ou seja, apenas poucas moléculas de dsRNAs por célula podem induzir uma resposta efetiva.

Em alguns organismos, tais como *C.elegans*, esta ação pode ser ainda mais potente (Mello *et al.*, 2004). Nestes, o RNAm alvo a ser degradado é amplificado pela ação de uma RNA polimerase RNA dependente (RdRP- *RNA dependent RNA polymerase*) (Cogoni *et al.*, 1999) (Figura 1.2), produzindo um grande número de cópias deste RNAm, aumentando a ação dos siRNAs (Sijen *et al.*, 2001). Esta amplificação pode levar a um silenciamento sistêmico e/ou ser transmitido à gerações seguintes (Sijen *et al.*, 2001). Este processo pode ser observado, além dos nematóides, em plantas e fungos (Sijen *et al.*, 2007) todavia, a ausência de RdRP em insetos e espécies de vertebrados, não permite a evidência deste processo (Roignant *et al.*, 2003). A princípio, a vantagem deste processo seria o surgimento de siRNAs correspondentes a regiões do RNAm alvo que não foram degradados anteriormente, levando ao silenciamento de múltiplos transcritos (Carthew *et al.*, 2009).

Com relação à miRNAs, como são de origem endógena, a biogênese se inicia com a ação de uma RNA polimerase de classe I ou III que gera transcritos primários de miRNAs (pri-RNAs), podendo ter de centenas a milhares de nucleotídeos caracterizados por uma ou mais estruturas *hairpin*. (Cai *et al.*, 2004; Lee Y *et al.*, 2004; Parizotto *et al.*, 2004). Em seguida, a forma estrutural dos pri-RNAs é reconhecida por uma RNase nuclear de classe II, denominada DROSHA (Lee Y *et al.*, 2002), acoplada a uma proteína ligadora de RNA (DGCR8 em humanos) (Denli *et al.*, 2004), que cliva o pri-RNA dando origem aos pre-miRNAs (precursores diretos dos miRNAs) de cerca de 60 a 70 nt (Lee Y *et al.*, 2002). Estes já possuem um emparelhamento imperfeito de bases que caracteriza uma ação relativamente inespecífica dos miRNAs gerados mais adiante. Tais precursores são identificados por um grupo fosfato na extremidade 5' e dois ou três nucleotídeos na extremidade 3'OH, e exportados do núcleo via poro nuclear formado pela proteína exportina 5 (EXP5) (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004). A partir de então, já no citoplasma, os pre-miRNAs vão seguir o mesmo processamento realizado pela enzima DICER descrito para os siRNAs (Figura 1.3).

Os siRNAs de origem endógena possuem precursores de dsRNA endógenos, mas que agem de forma alvo-específica. Sua função está sendo investigada em *D. melanogaster*, onde esses endo-siRNAs se relacionam principalmente com o silenciamento de elementos transponíveis (Fagegaltier *et al.*, 2009) e em

*Schizosaccharomyces pombe* onde atuam diretamente na formação de heterocromatina (Kloc *et al.*, 2008). O nematóide *C. elegans* também tem apresentado endo-siRNAs, contudo ainda não foram identificados em células humanas (Ruby *et al.*, 2006).

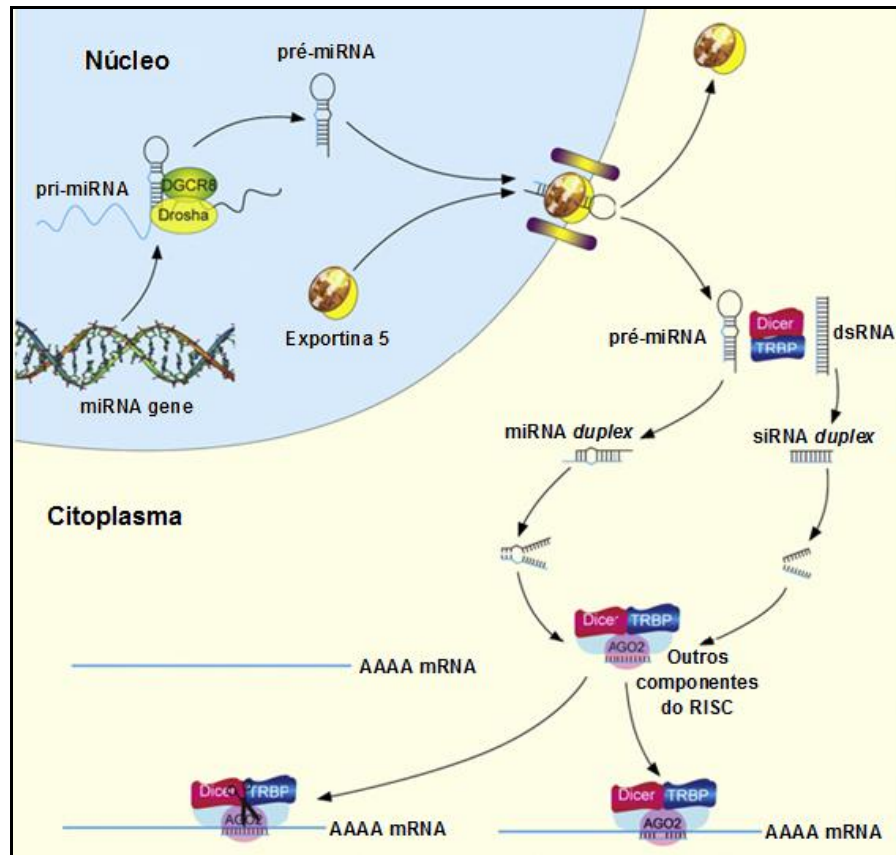


Figura 1.3: Biogênese de miRNAs (Li Y *et al.*, 2010 modificado).

#### 1.1.4. Princípios da utilização de siRNAs

Desde a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953, a sociedade científica se deparou com o desafio da caracterização dos genes e principalmente de suas funções. Diversas técnicas foram e tem sido desenvolvidas para análise e compreensão destas funções (Aigner, 2006).

Com relação às técnicas que utilizam ácidos nucléicos como ferramenta para o estudo da expressão gênica, voltados principalmente para genes de interesse clínico/terapêutico, encontramos três estratégias principais de ações que foram desenvolvidas nas últimas duas décadas, estes são: oligonucleotídeos antisense



(ODNs), riboenzimas de ação catalítica e mais recentemente a utilização de RNA de interferência (Aigner, 2006; Toklatian *et al.*, 2010).

O primeiro uso de ODNs para inibição da expressão gênica foi realizado em 1978 (Stephenson *et al.*, 1978; Zamecnik *et al.*, 1978), que resultaram na diminuição da replicação do vírus de sarcoma de Rous. Os ODNs são caracterizados estruturalmente por serem de fita simples, com cerca de 18 a 25 nucleotídeos. Sua ação baseia-se resumidamente no bloqueio da tradução por hibridização ao RNA mensageiro correspondente (Baker *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 1993; Walder *et al.*, 1988). Em meados da década de 80, modificações estruturais deram aos ODNs uma maior atividade e estabilidade, crescendo a expectativa de uma possível utilização terapêutica. Além disso, foi nesta época que ocorreram grandes avanços nas técnicas de empacotamento e transfecção em culturas celulares (Aigner, 2006). Contudo, o pouco sucesso com relação a ensaios clínicos randomizados, principalmente na fase de avaliação da eficácia (fase II), utilizando ODNs limitaram sua utilização terapêutica efetiva (Haasnoot *et al.*, 2007).

Com relação às riboenzimas, sua descoberta foi registrada no início dos anos 80 (Cech *et al.*, 1981; Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Sua estrutura baseia-se em RNAs de ação catalítica compostos por três hélices que agem clivando regiões de fita simples em RNAs alvo através de reações de hidrólise ou trans-esterificação independente da presença de outras proteínas (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Entretanto, devido à acentuada instabilidade no soro e dificuldades em estabelecer estratégias de “entrega” em tecidos alvos (Jarvis *et al.*, 1996), tais não obtiveram sucesso nos estudos relacionados a aplicações terapêuticas (Toklatian *et al.*, 2010).

O RNAi então surgiu como uma poderosa ferramenta para análise de identificação e função gênica, assim como uma nova alternativa para o desenvolvimento de terapias contra diversas doenças (Shrey *et al.*, 2009). A ação alvo específica elevada e a necessidade de poucas quantidades de siRNA para se garantir uma resposta efetiva são algumas das principais vantagens da sua utilização com relação às técnicas descritas acima (Vaishnaw *et al.*, 2010). Estudos revelaram que RNAi pode ser até mil vezes mais eficiente no silenciamento gênico que os ODNs (Bertrand *et al.*, 2002).

Além disso, os RNAs com ação interferente agem apenas diminuindo a expressão de determinado gene (*Knockdown*), não eliminando-o (*knockout*). No estudo da função gênica é comum o uso de técnicas que eliminam a expressão de genes específicos. Em mamíferos, o *knockout* é estabelecido pelo desenvolvimento de modelos experimentais em camundongos que, embora seja efetivo, possui desvantagens. A eliminação total de um gene dificulta a observação de efeitos tecido/células específicos, da interação genômica, além de ser custosa e trabalhosa. Neste contexto, a técnica de siRNA surgiu como uma alternativa relativamente pouco trabalhosa e eficiente para analisar tais funções (Sledz *et al.*, 2005).

Todavia, em células de mamíferos foi observado que a introdução de dsRNAs maiores que trinta pares de base (pb) ativa a via da *proteína kinase R* (PKR), levando a uma resposta de interferon e morte celular, sem ativar o mecanismo de RNA de interferência. Em 2001, Elbashir e colaboradores demonstraram que o mecanismo de RNAi poderia ser ativado através da utilização de siRNAs de 21-23nt, como subprodutos da ação de endonucleases. Este trabalho permitiu um grande avanço dos estudos em células de mamíferos (Elbashir *et al.*, 2001a).

Um outro aspecto inerente a utilização de siRNAs como ferramenta de manipulação gênica, é a entrega (*delivery*) dos oligonucleotídeos de forma alvo-específica, ou seja, a internalização das sequências em células e/ou tecidos, que devem ser de forma rápida, eficiente e em concentrações ideais (Tokatlian *et al.*, 2010) e que muitas vezes representam um fator limitante a utilização de siRNAs (ver item 1.1.5 mais adiante).

Atualmente existem duas estratégias principais de *delivery* envolvendo o uso de siRNAs quimicamente sintetizados, as baseadas em vetores virais e as que utilizam vetores não virais (Hajeri *et al.*, 2009).

Os métodos não virais utilizam nanopartículas de carga positiva que neutralizam a carga negativa característica dos ácidos nucleicos em geral, incluindo siRNAs, facilitando a penetração em membranas celulares de carga tipicamente negativa. (Toklatian *et al.*, 2010). Existe uma enorme gama de nanopartículas que podem ser acopladas aos siRNAs, sendo a escolha dependente de vários fatores como o tamanho das partículas e principalmente do modelo experimental escolhido (*in vitro* ou *in vivo*). Podem ser utilizados, polímeros catiônicos, tais como PEG

(polietilenoglicol) (Merkel *et al.*, 2009), lipídios catiônicos, que incluem a maioria dos kits de transfecção comercial (Kim *et al.*, 2009), lipossomas neutros (Yagi *et al.*, 2009), peptídeos (Moschos *et al.*, 2007), dentre outros. A internalização pode ser feita ainda através de processos físicos como a eletroporação (Moore *et al.*, 2010) e injeção hidrodinâmica (Bradley *et al.*, 2005).

Os vetores plasmidiais constituem também uma opção de *delivery*, apesar de trabalhoso, permitem um efeito não transiente dos siRNAs que serão expressos continuamente (Peng *et al.*, 2007; Hajeri *et al.*, 2009). Os vetores virais podem incluir o uso de Adenovírus (Hosono *et al.*, 2004), vírus associados à adenovírus (AAV), (Heister *et al.*, 2002), lentivírus (Rubinson *et al.*, 2003) Retrovírus (Barquinero *et al.*, 2004), Herpes (Sabbioni *et al.*, 2007) e Baculovírus (Lu *et al.*, 2006).

Geralmente, os métodos não virais são preconizados em relação aos virais, principalmente no desenvolvimento de terapias, devido a maior acessibilidade e metodologia simplificada. Além disso, evita-se uma infecção secundária pelo vírus vetor (Hajeri *et al.*, 2009).

### **1.1.5. Aplicações de siRNAs**

As possíveis aplicações dos siRNAs são de uma enorme variedade, indo da utilização em plantas até o desenvolvimento de terapias contra diversas doenças em seres humanos.

Em plantas, onde o mecanismo foi descrito inicialmente, o processo mais utilizado para silenciar genes através de siRNAs, tem sido a partir de construções de dsRNA que são facilmente expressos em plantas transformadas. Estes são utilizados tanto para o silenciamento de genes endógenos específicos quanto de genes exógenos provenientes de patógenos invasores (Mansoor *et al.*, 2006).

Com relação ao primeiro aspecto, em plantas de café (*Coffea spp.*), por exemplo, o silenciamento do gene CaMXMT1, envolvido na via biosintética da cafeína, pode ocasionar a redução de sua síntese levando ao desenvolvimento de plantas de café descafeinado (Ogita *et al.*, 2004). Ainda assim, o aumento da síntese de ácidos graxos em sementes de algodão, resultante do silenciamento dos genes envolvidos na sua biossíntese (ghSAD-1 e ghFAD2-1) levam a produção de sementes mais oleaginosas de interesse comercial (Liu *et al.*, 2002). Estudos ainda

revelam, o desenvolvimento de plantas alergênicas (Petrovska *et al.*, 2005), batatas mais resistentes a estocagem, resultante da inibição do gene polifenil oxidase responsável pelo escurecimento enzimático (Wesley *et al.*, 2001) e o aumento de carotenóides em tomate com o silenciamento do gene Det 1 (Davuluri *et al.*, 2005).

Para o desenvolvimento de plantas resistentes a infecções virais, foi observado a redução da acumulação de partículas virais de ACMV (*African cassava mosaic vírus*) no protoplasto de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), a partir do silenciamento do gene associado à replicação viral (*Replication-associated protein gene*) (Vanitharani *et al.*, 2003). Foi visto ainda um bloqueio na infecção viral por PMMoV (*Pepper mild mottle vírus*) e TEV (*Tobacco etch vírus*), também em plantas de tabaco (Tenllado *et al.*, 2003).

Vetores virais fitopatogênicos são também utilizados para silenciar genes do hospedeiro. Este processo é conhecido como *virus-induced gene silencing* (VIGS) e permite uma maior ação do silenciamento, contudo, o método abrange somente plantas que são susceptíveis aos vírus no qual o vetor VIGS é baseado (Jones *et al.*, 2001).

Outra estratégia já evidenciada é a utilização de bactérias que expressam siRNAs, aplicadas topicamente como um pulverizador de extratos bacterianos. A resistência a vírus como PMMoV (*Pepper mild mottle vírus*) e PPV (*Plum pox virus*) tem sido alcançado através do pulverizador bacteriano contendo dsRNAs específicos que são aplicados às plantas 5 dias antes do desafio viral. Este poderia ser considerado um método alternativo de indução do silenciamento sem a necessidade de produção de plantas transgênicas (Tenllado *et al.*, 2003).

Em nematóides, tais como *C.elegans*, e em insetos, principalmente *D. melanogaster*, siRNAs e miRNAs tem sido investigado principalmente para a elucidação de aspectos moleculares envolvidos em ambos os processos. A isto se deve principalmente ao fato de que foram nesses organismos que o mecanismo foi descrito primeiro, tornando-se importantes modelos experimentais, além da relativa praticidade em trabalhar com tais modelos. Entretanto, podemos encontrar trabalhos onde siRNAs são utilizados para silenciar genes de interesses em tais espécies, como o estudo relacionado ao silenciamento de uma variante *PK-A* que gera paralisia no início da vida adulta em *C. elegans* (Murray *et al.*, 2008) como também

de genes envolvidos no mecanismo de retroposição em *D. melanogaster* (Tchurikov *et al.*, 2007).

No contexto de utilização de siRNAs como ferramenta no desenvolvimento de terapias contra doenças, o uso de siRNAs pode seguir duas vertentes: servindo para identificação direta de genes responsáveis por doenças, tornando-os importantes alvos para o desenvolvimento de drogas terapêuticas. Por exemplo, o silenciamento da expressão de um produto do gene AML1/MTG8 envolvido na Leucemia Mieloide Aguda pode levar a um aumento da susceptibilidade celular a fatores de crescimento, mostrando que o produto deste gene é responsável por favorecer o desenvolvimento da leucemia (Heidenreich *et al.*, 2003), ou serem desenvolvidos como a própria terapia, como para o tratamento da degeneração neovascular relacionada a idade, onde siRNA foi desenvolvido como um produto (Sirna-027) para combater a doença através do silenciamento de um receptor de fator de crescimento-1 associado a doença (Kaiser *et al.*, 2010).

A tecnologia do siRNA pode ser também aplicada no campo da imunologia, buscando a elucidação de mecanismos envolvidos tanto no sistema imune inato quanto o adaptativo (Shrey *et al.*, 2009).

No sistema imune inato, o silenciamento baseado em siRNA do fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), associado ao evento de apoptose de células neuronais, tem ajudado a elucidar aspectos relacionado a desordens no sistema nervoso (Moschos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010).

No sistema imune adaptativo, a diminuição da expressão dos genes PI8INK4C e P27KIPI (inibidores de cinase dependentes de ciclina) demonstraram a importância da ação destas ciclinas na linfopoiese de linfócitos B (Wang *et al.*, 2010). Em linfócitos T CD4+, também foi observado que a repressão do gene GATA3 influencia na diferenciação destes linfócitos (Skapenko *et al.*, 2004). Além disso, estudos de silenciamento com siRNAs tem ajudado na elucidação de aspectos genéticos voltados a doenças auto imunes (Pruijn *et al.*, 2006).

Muitos estudos também são realizados para alvos oncogênicos, com o intuito do desenvolvimento de terapias contra o câncer (He *et al.*, 2009). Os possíveis candidatos a alvos incluem genes associados à proliferação celular, metástase,

angiogênese e resistência a drogas (Ashihara *et al.*, 2010). Neste contexto, os miRNAs também desempenham um importante papel (Duchaine *et al.*, 2009).

Um dos estudos mais recentes demonstraram um aumento na sensibilidade droga gemcitamina, em células de câncer pancreático *in vitro*, a partir do silenciamento com siRNA de genes envolvidos na resistência a esta droga (Xiong *et al.*, 2010).

A aplicação de siRNAs para inibir a replicação viral, talvez seja um dos maiores campos de ação desta tecnologia (Haasnoot *et al.*, 2007). Tais siRNAs podem ser utilizados para inibir vários estágios do ciclo replicativo viral (Figura 1.4). Os alvos podem ser tanto RNAs virais quanto celulares envolvidos no processo de replicação (Colbère-Garapin *et al.*, 2005).

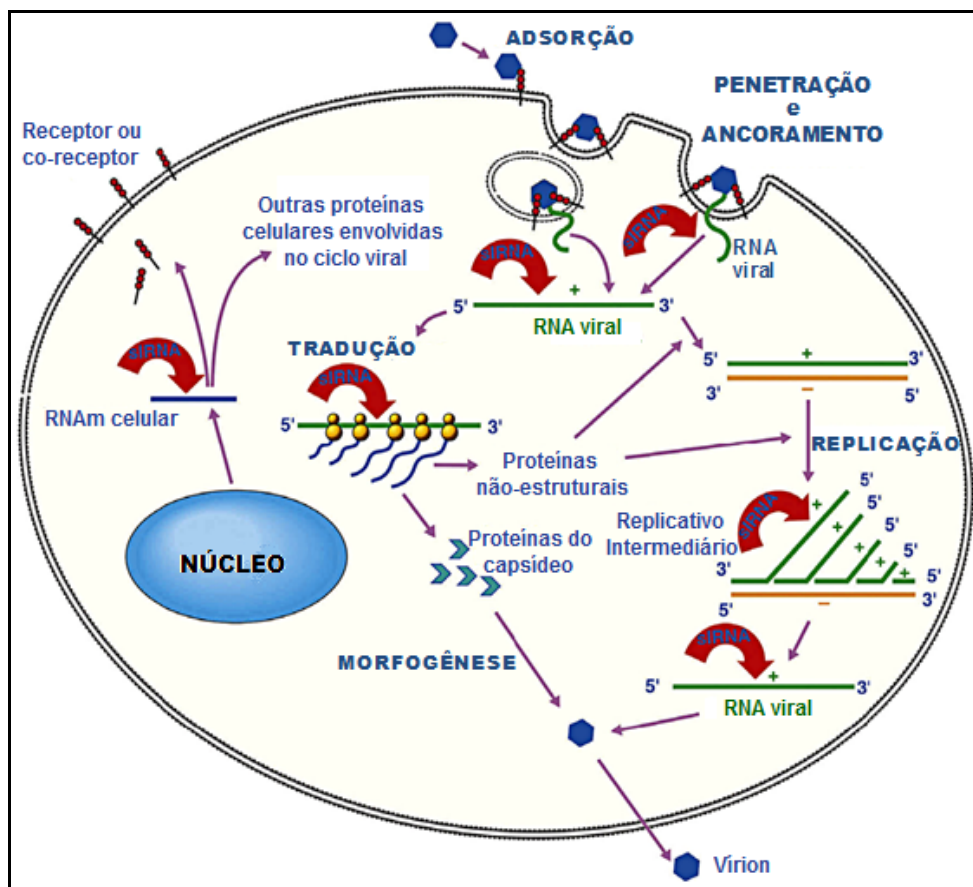


Figura 1.4: Múltiplos possíveis alvos envolvidos no silenciamento por siRNAs durante o ciclo replicativo viral (Colbère-Garapin *et al.*, 2005 modificado).

O primeiro trabalho de inibição de um vírus humano por siRNAs foi realizado com o vírus sincicial respiratório (RSV) em 2001 (Bitko *et al.*, 2001). A partir de então vários outros vírus foram inibidos com sucesso com a ação de siRNAs, tais como, vírus da hepatite C (HCV) (Kronke *et al.*, 2004; Yokota *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2003; Takigawa *et al.*, 2004; Khaliq *et al.*, 2010), Hepatite B (HBV) (McCaffrey *et al.*, 2003; Shlomai *et al.*, 2003; Weinberg *et al.*, 2010), Síndrome respiratória aguda severa por coronavírus (SARS/CoV) (He *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005), Influenza (Ge *et al.*, 2003; Seth *et al.*, 2010), incluindo o vírus causador da gripe A (Nova gripe-H1N1), responsável pela recente pandemia (Zhiqiang *et al.*, 2010) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Coburn *et al.*, 2002; Jacque *et al.*, 2002; Lee NS *et al.*, 2002; Novina *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003; Pache *et al.*, 2010). Com relação à família dos *Picornaviridae*, onde se encontra classificado o vírus da Hepatite A, foi demonstrado o silenciamento para coxsackievirus B3 (CBV-3) (Schubert *et al.*, 2007), Coxsackievirus B4 (CVB4) (Tan *et al.*, 2010), Enterovírus 71 (Wu *et al.*, 2009) e do vírus da hepatite A (Kusov *et al.*, 2006).

Com relação ao silenciamento do vírus da hepatite A, realizado pelo estudo de Kusov e colaboradores em 2006 citado acima, foram avaliados o silenciamento de seis sequências previamente descritas (Kanda *et al.*, 2004), das quais três foram utilizadas neste estudo. Foram observados ainda a temporalidade da ação das sequências *in vitro* em células de hepatoma humano (Huh-7).

### **1.1.6. Limitações na utilização de siRNAs**

#### **• Especificidade das sequências**

Uma das limitações da tecnologia de RNAi é a especificidade das sequências de siRNA a serem utilizadas. Mesmo seguindo as regras recomendadas para o desenho das sequências, o silenciamento efetivo do gene alvo não é assegurado. A eficácia da supressão da expressão gênica depende de inúmeros fatores, incluindo não somente a escolha da sequência, mas também da estrutura e meia vida do RNAm alvo e do tipo de célula em que será inserido o siRNA (Kim *et al.*, 2005; Siolas *et al.*, 2005). Além disso, restrições ao tipo de polimerase utilizada para reconhecer e amplificar as sequências de siRNAs devem ser consideradas (Sioud *et al.*, 2004). Embora siRNAs sejam relativamente estáveis em condições de culturas

celulares, eles requerem uma maior estabilidade nucleásica quando na circulação “*in vivo*”, para isso modificações químicas dos siRNAs que reforçam a estabilidade tem sido desenvolvidas (Sledz *et al.*, 2005; Reischl *et al.*, 2009).

- **Entrega dos oligonucleotídeos (*delivery*).**

Mecanismos eficientes para o *delivery* das sequências de siRNA às células alvo *in vitro* e *in vivo* constituem um dos aspectos mais relevantes. Grandes avanços nas tecnologias de *delivery*, já descritas acima, são observados, contudo, *in vivo*, aspectos como a instabilidade de siRNAs no soro, em média dez minutos (Akhtar *et al.*, 2007), e a degradação endossomal após a internalização (Jere *et al.*, 2009) tornaram-se necessários o desenvolvimento de técnicas mais potentes para minimizar tais efeitos. A modificação química dos siRNAs e a agregação com polímeros catiônicos tem-se mostrado como estratégias favoráveis para utilização *in vivo* (Reischl *et al.*, 2009).

- **Efeitos de inibição inespecífica (*off-target*)**

Os efeitos *off-target* são quando genes específicos que não são alvos no estudo, apresentam uma resposta alterada pela ação do siRNA. Tais efeitos, são inerentes limitações, tanto para a pesquisa básica, quanto para aplicações clínicas e devem ser considerados cuidadosamente. Inicialmente, estudos reportando o sucesso das aplicações de siRNAs *in vitro* acabaram por não levar em consideração os múltiplos efeitos que dsRNAs poderiam ocasionar ao metabolismo celular. Em vários casos, estes efeitos secundários não são aparentes, a menos que sejam realizados estudos globais da expressão gênica, além do esperado com o silenciamento do gene alvo. siRNAs podem ativar trajetórias alternativas de resposta a dsRNAs dentro da célula, levando a diminuição de um grande número de genes, que geralmente dependem da sequência utilizada (Sledz *et al.*, 2005).

Finalmente, em sistemas onde siRNAs e miRNAs estão presentes simultaneamente, ambos poderiam intervir na via de ação do outro, devido ao compartilhamento da mesma maquinaria intracelular nos dois mecanismos (Sledz *et al.*, 2005).



- **Escape da ação de siRNAs**

Já foi observado que alguns vírus são capazes de produzir proteínas virais que exibem uma atividade supressora a ação de siRNAs, tais como a proteína NS1 pertencente à influenza vírus tipo A, proteína E3L do vírus vaccinia (Li *et al.*, 2004) e a proteína Tas em HIV-1 (Bennasser *et al.*, 2005). Ainda não está claro como tais proteínas interferem da ativação dos siRNAs (Haasnoot *et al.*, 2007). Além disso, alguns vírus podem escapar da ação dos siRNAs por modificações estruturais do RNAm alvo, que adquire estruturas que inabilitam a degradação pelos siRNAs (Westerhout *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004; Itaya *et al.*, 2007).

## 1.2. Vírus da hepatite A

### 1.2.1. Histórico

A doença descrita como “icterícia” na literatura das antigas civilizações grega, romana e chinesa, provavelmente era uma hepatite viral. A etiologia viral foi postulada como causa de certas formas de icterícia logo em 1912 e o termo “hepatite infecciosa” foi usado pois a doença muitas vezes ocorria em epidemias, como a ocorrida na ilha de Menorca, Espanha, durante o século XVIII (Cockayne, 1912).

Em 1931, Findlay e colaboradores publicaram um artigo em que se revisava a história das epidemias de icterícia e surtos em Surrey, Inglaterra, na época, e concluíram que estes eram causados provavelmente por um “vírus ultra-microscópico que é patogênico somente no homem”. A transmissão da doença de homem para homem foi relatada experimentalmente em voluntários na Alemanha em 1942 (Voegt, 1942), e no Oriente Médio em 1943 (Cameron, 1943), mais de 25 anos antes da transmissão em um modelo animal (Holmes *et al.*, 1969).

A hepatite A, foi então descrita primeiramente em 1967 (Krugman *et al.*, 1967), tendo como agente etiológico o vírus da hepatite A (HAV). Este é conhecido como um dos cinco vírus causadores de hepatites virais, cujo principal local de replicação é o fígado. Estudos epidemiológicos e de transmissão com humanos demonstraram que a hepatite infecciosa, ou hepatite A, era transmitida principalmente pela via fecal-oral (Krugman *et al.*, 1959, 1962, 1967). Em 1973, o HAV foi identificado pela primeira vez nas fezes de pessoas infectadas (Feinstone *et al.*, 1973), desencadeando a partir de então o desenvolvimento de testes diagnósticos, propagação em cultura de células, caracterização molecular e desenvolvimento de uma vacina (Feinstone *et al.*, 1983; Provost *et al.*, 1979).

### 1.2.2. A partícula viral

O vírus da hepatite A (HAV) possui genoma RNA de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 7,5 quilobases (Kb) de comprimento (Najarian *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1987a, 1987b; Hollinger, 1996). A partícula viral não possui envelope, tendo simetria icosaédrica com 27 a 32 nanômetros (nm) de diâmetro (Feinstone *et al.*, 1973). Atualmente classificado no gênero *Hepatovirus* da família *Picornaviridae*. Ao contrário de outros membros desta família, o HAV tem replicação lenta em cultura celular e raramente causa efeito citopático (Lemon *et al.*, 1992). O HAV pode resistir de forma estável por pelo menos um mês no ambiente (McCaustland *et al.*, 1982). A inativação do HAV em alimentos requer o aquecimento a 85°C por um minuto e a desinfecção de superfícies é obtida com um minuto de contato com uma diluição de 1:100 de hipoclorito de sódio (Weber *et al.*, 1999; Margolis, 2000; Strazynski *et al.*, 2002).

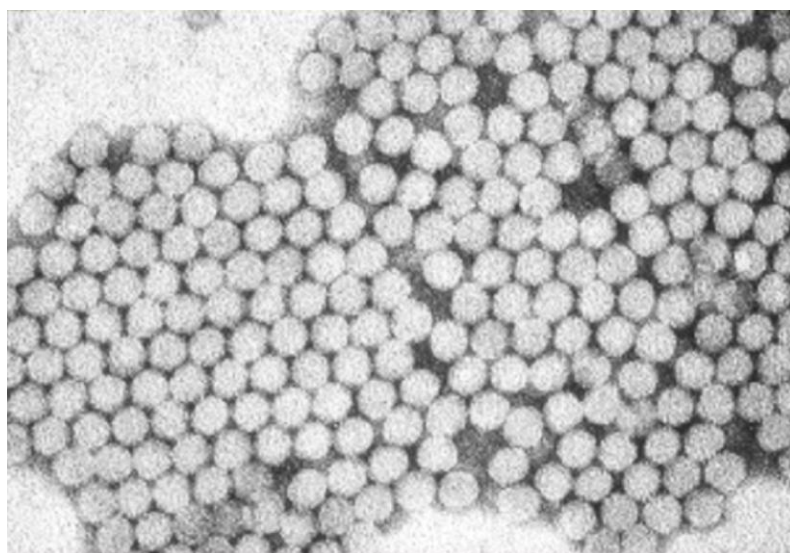


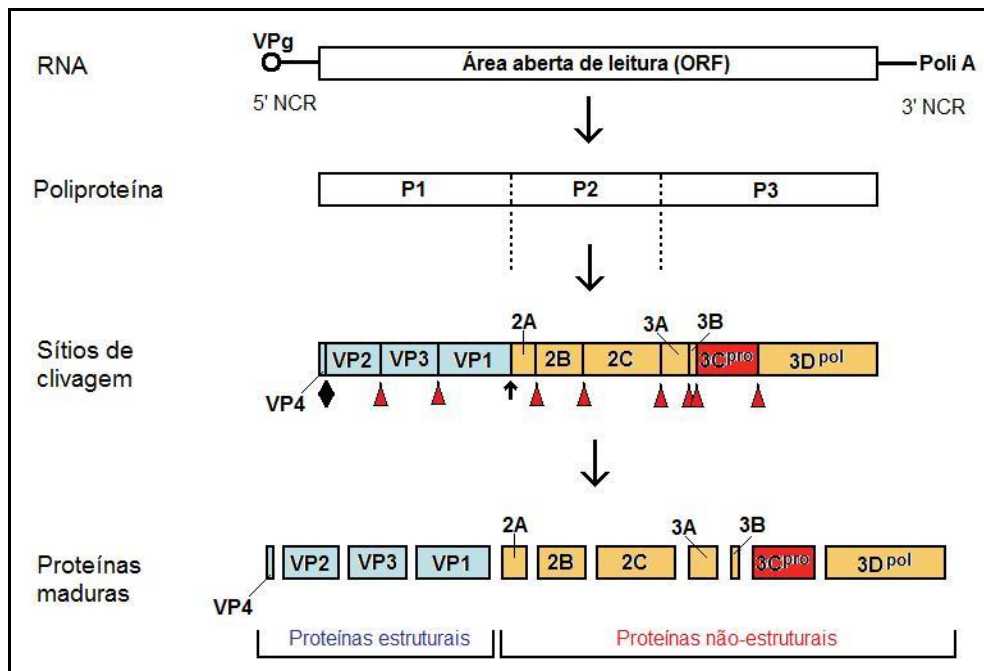
Figura 1.5 : Microscopia Eletrônica do HAV (fonte: CDC, 2009 <http://www.cdc.gov>).

### 1.2.3. Organização genômica e Proteínas do HAV

A organização genômica do HAV segue um padrão semelhante ao encontrado em outros gêneros da família (Hollinger, 1996), sendo composto de três regiões. Uma região 5' não-codificante (NC) de 734 a 740 nt, considerada a porção mais conservada do genoma. Uma região codificante, com somente uma fase aberta de leitura (ORF), responsável por codificar uma poliproteína de 2.225 a 2.227

aminoácidos (6.675 a 6.681 nucleotídeos) que é dividida em três regiões distintas (P1, P2 e P3). Após uma clivagem mediada por uma protease viral (3Cpro) (Schultheiss *et al.*, 1994) as três regiões darão origem a proteínas estruturais e não estruturais. Por último, uma região 3' não-codificante de 40 a 80 nt com cauda poli-A (Baroudy *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1987b; Hollinger, 1996). As regiões 5' NC e 3' NC possuem atividades regulatórias essenciais ao processo de replicação e tradução (Brown *et al.*, 1991; Jia *et al.*, 1996) (Figura 1.6).

Recentemente, foi observado que o genoma do HAV é capaz de suportar inserções contendo aproximadamente 600 nt adicionais, sem perda da infectividade (Konduru *et al.*, 2009), permitindo o desenvolvimento de estratégias que utilizam o HAV como possível vetor de expressão gênica no fígado ou até no desenvolvimento de combinações de vacinas.



**Figura 1.6: Organização do genoma do HAV (isolado viral tipo selvagem HM175). O RNA genômico (fita positiva) contém somente uma área aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína. A protease viral, 3Cpro (retângulo vermelho) cliva nos sítios identificados com triângulo vermelho. Uma protease celular ainda não identificada (seta curta) cliva a região VP1/2A e uma atividade proteolítica desconhecida (losango preto) cliva a região VP2/VP4. (Modificado de Totsuka *et al.*, 1999 e Martin *et al.*, 2006).**

A região P1, localizada na extremidade amino-terminal da poliproteína, codifica as quatro principais proteínas do capsídeo viral que são 1D (VP1), 1B (VP2) e 1C (VP3) e 1A (VP4) (Gauss-Muller *et al.*, 1986), sendo esta última, essencial na formação da partícula viral, contudo indetectável na forma madura (Probst *et al.*, 1999; Totsuka *et al.*, 1999). A proteína VP2 é resultante de um processo autocatalítico, constituindo uma das principais proteínas estruturais do vírus. Já a VP1, é a maior proteína do capsídeo viral, responsável pela formação dos epítomos conformacionais junto com a VP3 (Lemon *et al.*, 1992).

A região P2 codifica a proteína 2A, que parece atuar como uma proteína precursora do capsídeo e na morfogênese viral (Cohen *et al.*, 2002), a 2B que está envolvida na estabilidade da membrana (Jecht *et al.*, 1998) e a 2C que tem atividade de helicase (Dolja *et al.*, 1992).

Geralmente, a região VP1/2A é inicialmente preconizada para análise filogenética viral, contudo, Joshi e colaboradores demonstraram que a região 2C também parece ser adequada para este tipo de análise (Joshi *et al.*, 2008). Além disso, foi observado uma possível associação entre a severidade da hepatite A e variações em aminoácidos da região 2C (Fujiwara *et al.*, 2007).

A região P3, codifica as proteínas 3A, denominada Pré-VPg, que ancora a proteína 3B no HAV-RNA, 3B denominada VPg, covalentemente ligada ao HAV-RNA, podendo desempenhar um papel iniciador (*primer*), a proteína 3C de atividade proteolítica, influenciando na replicação do genoma viral e a proteína 3D, considerada uma RNA polimerase RNA dependente, essencial no ciclo replicativo (Weitz *et al.*, 1986; Gauss-Muller *et al.*, 1991; Peters *et al.*, 2005; Lemon., 1997). Recentemente, foi observado que mutações pontuais na região 3D do genoma do HAV pode ser determinante na taxa de crescimento do HAV em cultura celular e a resistência a antivirais (Konduru *et al.*, 2010).

#### **1.2.4. Replicação viral**

O processo replicativo se inicia com a adsorção do vírus à receptores específicos para o HAV, presentes sobretudo na membrana celular de hepatócitos. Estes receptores são denominados HAVcr-1 em células de rim de macaco verde africano (Kaplan *et al.*, 1996) e huHAV em células humanas (Feigelstock *et al.*,

1998). O vírus então penetra na célula hospedeira, perdendo inicialmente o capsídeo viral (desnudamento), acarretado por mudanças estruturais desencadeadas pelo ambiente citoplasmático. Após o desnudamento, o RNA viral infeccioso (polaridade positiva) é liberado no citoplasma, podendo agir diretamente como RNAm. Este será direcionado ao ribossomo pelo sítio interno de ligação ribossomal (IRES) situado na região 5' NC do genoma do HAV, sendo responsável pelo início da tradução (Brown *et al.*, 1991; Jia *et al.*, 1996). O RNAm viral será então traduzido na poliproteína descrita anteriormente que após uma série de clivagens darão origem a proteínas não estruturais e as proteínas estruturais do HAV. Além disso, o RNA viral funcionará como molde para síntese de um RNA complementar, replicativo intermediário (polaridade negativa), catalisada principalmente por uma RNA polimerase RNA dependente, dando origem a novas fitas de polaridade positiva e novos RNAs mensageiro. Esta etapa ocorre principalmente associada a membranas do retículo endoplasmático. Uma vez que as proteínas estruturais já estão formadas no citoplasma da célula, inicia-se o processo de formação da partícula viral, podendo ou não contar o RNA viral infeccioso (partícula defectiva) (Bishop *et al.*, 2000), a partir de então, ocorre a saída da partícula viral geralmente sem causar a lise celular (Kusov *et al.*, 2005).

### **1.2.5. Diversidade genética do HAV**

O vírus da hepatite A apresenta um alto grau de conservação tanto antigênica quanto genômico (Cohen *et al.*, 1987a, 1987b; Robertson *et al.*, 1992). No entanto, a diversidade genética existente é suficiente para definir diversos genótipos e subgenótipos do HAV (Robertson *et al.*, 1992).

Atualmente, o HAV é classificado em seis genótipos distintos (I-VI), três genótipos (I, II e III) são de origem humana e três (IV, V e VI) são de origem símia, sendo os genótipos I, II e III divididos em subgenótipos A e B. Geralmente, a variação genômica dentro da junção VP1/2A é a utilizada para definir genótipos e subgenótipos, podendo ter de 15% a 25% de variação entre genótipos e aproximadamente 7% a 7,5% nos subgenótipos (Robertson *et al.*, 1992). Anteriormente, a classificação previa um sétimo genótipo (genótipo VII), de origem humana, contudo ele foi desclassificado e incluído como um subgenótipo do

genótipo II (Costa-Mattioli *et al.*, 2002b; Lu *et al.*, 2004). Em humanos, os genótipos I e III são os mais prevalentes (Nainan *et al.*, 2006). No Brasil, somente o genótipo I foi detectado, especialmente o genótipo IA (de Paula *et al.*, 2004) seguido pelo genótipo IB (de Paula *et al.*, 2002; Devalle *et al.*, 2003; Villar *et al.*, 2004; de Paula *et al.*, 2006; Villar *et al.*, 2006).

### **1.2.6. Sorotipo e antigenicidade**

Apesar da heterogeneidade genotípica do vírus, apenas um único sorotipo de HAV existe. Isto permite que preparados de imunoglobulinas contendo anti-HAV, independente da sua origem geográfica, ofereçam proteção contra a doença. Além disso, vacinas preparadas de isolados do vírus originados da Austrália ou Costa Rica conseguem proteger de infecções em todo o mundo (Nalin *et al.*, 1993; Innis *et al.*, 1994).

A estrutura antigênica do vírus é relativamente simples, com um número restrito de epítomos e um único sítio antigênico dominante que interage com os anticorpos neutralizantes do vírus. Esses epítomos são conformacionais e formados por aminoácidos localizados em mais de uma proteína do capsídeo (Stapleton *et al.*, 1987; Ping *et al.*, 1988; Nainan *et al.*, 1992; Ping *et al.*, 1992).

Partículas vazias parecem ser antigenicamente indistinguíveis de partículas infecciosas (vírions contendo o RNA), sugerindo que a antigenicidade pode depender das principais proteínas de montagem do capsídeo ou pequenos precursores do capsídeo. A produção da poliproteína recombinante do HAV foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes para o HAV (LaBrecque *et al.*, 1998).

Variantes antigênicas do HAV que ocorrem naturalmente foram observadas somente em vírus isolados de macacos do “Velho Mundo” (Nainan *et al.*, 1991; Tsarev *et al.*, 1991). Esses vírus são geneticamente distintos dos isolados de HAV humanos e não são reconhecidos por certos anticorpos monoclonais produzidos contra HAV de humanos (Karenyi *et al.*, 1989; Nainan *et al.*, 1991). Entretanto, o HAV de símios liga-se a anticorpos policlonais anti-HAV de humanos (Emerson *et al.*, 1996). Recentemente, foram relatados isolados de HAV de humanos com substituição de aminoácidos do capsídeo e deleção de sítios antigênicos imunodominantes (Costa-Mattioli *et al.*, 2002b; Sánchez *et al.*, 2002), no entanto,

ainda não está claro se a neutralização do vírus por anticorpos foi afetada com essas mudanças (Nainan *et al.*, 2006).

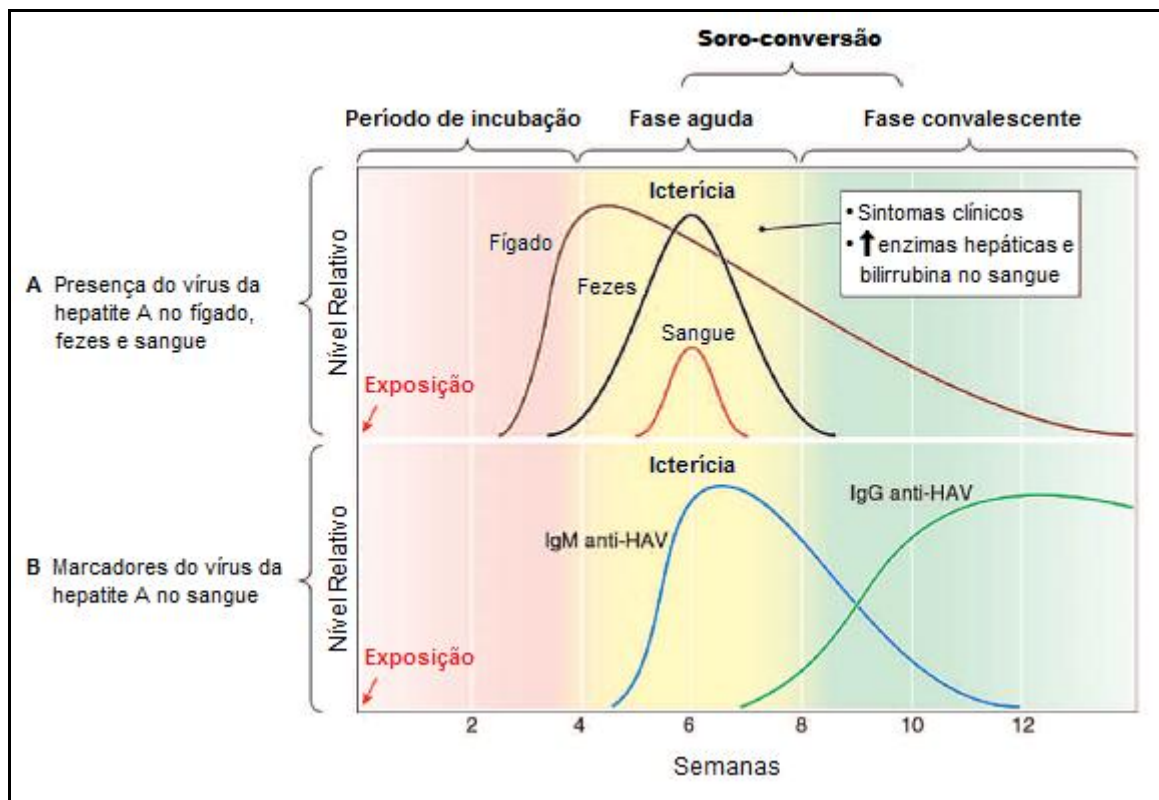
### **1.2.7. Características Clínicas**

A infecção pelo HAV é geralmente auto-limitada podendo não causar sintomas ou até levar ao óbito por hepatite fulminante (Nainan *et al.*, 2006; Hollinger *et al.*, 2007). A probabilidade da doença clinicamente aparente associada à infecção pelo HAV aumenta com a idade. Em crianças de até seis anos de idade, a maioria das infecções (70%) é assintomática com ausência de icterícia (Hadler *et al.*, 1980; Fischer *et al.*, 2009). Entre os adolescentes e adultos, as infecções são geralmente sintomáticas, com icterícia ocorrendo em 70% dos pacientes (Lednar *et al.*, 1985; Fischer *et al.*, 2009). Após um período médio de incubação de 28 dias (intervalo de 15 a 50 dias), a maioria das pessoas infectadas pelo HAV desenvolve sintomas constitucionais inespecíficos seguidos por sintomas gastrointestinais. Normalmente, incluem febre, mal-estar, anorexia, náusea, desconforto abdominal, acolia fecal, bilirrubinúria e icterícia, que geralmente duram dois meses. No entanto, 15 a 20% dos pacientes podem ter recidiva da doença ou doença prolongada com duração de até seis meses (Sjogren *et al.*, 1987; Glikson *et al.*, 1992; Fischer *et al.*, 2009). Neste caso, o vírus pode ser detectado no soro de seis meses a um ano após a infecção (Bower *et al.*, 2000), no fígado (van den Anker *et al.*, 1988), nas fezes, com conseqüente aumento dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) (Sjogren *et al.*, 1987). A principal complicação da infecção pelo HAV é a hepatite fulminante (HF) que ocorre em menos de 1% dos casos de hepatite A (Leung *et al.*, 2005). Em 2006, cerca de 0,3% de óbitos por hepatite A foram relatados nos EUA pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) (Dentinger, 2009). No Brasil, aproximadamente 33% dos casos de hepatite fulminante é causado pelo HAV (dos Santos *et al.*, 2009).



### 1.2.8. Patogenia

Logo após a ingestão oral do HAV, o destino dos vírions são o estômago e o intestino (Asher *et al.*, 1995), chegando ao fígado através do sistema porta hepático. O HAV é um vírus hepatotrópico, produz viremia e é excretado na bile e detectado nas fezes de pessoas infectadas. As fezes de um indivíduo infectado podem conter até  $10^9$  partículas virais por grama e são a fonte primária de infecção pelo HAV (Skinhoj *et al.*, 1981; Tassopoulos *et al.*, 1986). Como regra geral, o pico da eliminação viral nas fezes ocorre antes do início da icterícia, dos sintomas ou da elevação das enzimas hepáticas (Skinhoj *et al.*, 1981; Tassopoulos *et al.*, 1986) e decai após o aparecimento da icterícia (Figura 1.7). Comparado aos adultos, crianças e bebês podem excretar o vírus por períodos mais longos, ou seja, até vários meses após o início da doença clínica (Chiriaco *et al.*, 1986; Tassopoulos *et al.*, 1986).



**Figura 1.7: Fases clínicas e marcadores séricos da infecção. A:** A infecção do fígado é rapidamente seguida pelo aparecimento do vírus nas fezes. **B:** A icterícia ou outros sintomas da infecção aguda são acompanhados pelo aparecimento de anticorpos IgM no sangue na fase aguda. O aparecimento de anticorpos IgG sinaliza a recuperação e imunidade contra reinfecções. (Dentinger *et al.*, 2009 modificado).

A viremia se inicia uma a duas semanas após a exposição com o HAV e persiste durante o período da elevação das enzimas hepáticas, baseado em estudos em humanos e chimpanzés experimentalmente infectados (Krugman *et al.*, 1962; Giles *et al.*, 1964; Margolis *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1989; Lemon, 1994; Asher *et al.*, 1995; Brundage *et al.*, 2006; Nainan *et al.*, 2006). A concentração do vírus no soro é de 2 a 3 log<sub>10</sub> menor do que em fezes (Cohen *et al.*, 1989; Lemon, 1994; Bower *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2006). Bower e colaboradores em 2000 descreveram que HAV estava presente de três a quatro semanas antes do início do aparecimento da icterícia e a concentração do vírus era maior durante o período que antecede o início da elevação das enzimas hepáticas. A viremia pode estar presente por um período muito mais longo durante a fase convalescente da hepatite A, do que os dados anteriormente relatados (Yotsuyanagi *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1997; Bower *et al.*, 2000; Nainan *et al.*, 2006; Brundage *et al.*, 2006), apesar da baixa concentração do vírus eliminada nesse período.

O vírus também é excretado na saliva de muitos pacientes com hepatite A (Mackiewicz *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2008). Contudo, não há dados epidemiológicos afirmando que a saliva seja uma significativa fonte de transmissão de HAV (Nainan *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral às proteínas estruturais do HAV ocorre antes do início dos sintomas. Anticorpos IgM para o HAV (IgM anti-HAV) são detectáveis antes ou no início da doença clínica (detecção precoce) (Kao *et al.*, 1984), reduzindo em cerca de três a seis meses, tornando-se indetectáveis pelos testes de diagnóstico comerciais (de Paula *et al.*, 2004; Kiyohara *et al.*, 2009). Anticorpos IgG para o HAV (IgG anti-HAV) aparecem logo após a fase aguda da doença, persistindo por anos depois da infecção e conferem imunidade ao longo da vida (Skinhoj *et al.*, 1977). A IgA também é produzida durante a infecção por um tempo limitado (Locarnini *et al.*, 1980; Angarano *et al.*, 1985). O papel da IgA na resposta contra o HAV ainda é desconhecido. Ao contrário de outros membros da família *Picornaviridae*, o HAV não parece suscitar uma resposta imune intestinal eficaz (Stapleton *et al.*, 1991).

Os anticorpos IgG e IgA anti-HAV são detectados no soro, saliva, urina e fezes (Locarnini *et al.*, 1978, 1980; Perry *et al.*, 1992; Joshi *et al.*, 2002; Amado *et al.*, 2006). Testes de saliva foram relatados como uma alternativa aos testes sorológicos convencionais para o anti-HAV, devido a sua simplicidade na coleta da amostra (Jacobson *et al.*, 1995; Ochnio *et al.*, 1997; Oba *et al.*, 2000). Vários estudos têm demonstrado os benefícios da aplicação de testes de saliva como uma ferramenta de triagem em investigações de surtos e estudos epidemiológicos (Hurni *et al.*, 1993; Jacobson *et al.*, 1995; Laufer *et al.*, 1995; Amado *et al.*, 2008).

### 1.2.9. Diagnóstico

- **Detecção de anticorpos HAV-específicos**

A resposta imune humoral desempenha um papel fundamental no diagnóstico da infecção pelo HAV e na diferenciação da hepatite A de outros tipos de hepatites virais. Há uma série de testes comerciais disponíveis no mercado para detecção de IgM anti-HAV e anti-HAV total (Jindal *et al.*, 2002; Poddar *et al.*, 2002; Dignani *et al.*, 2003). A hepatite causada pelo vírus da hepatite A é clinicamente indistinguível da doença causada pelas outras hepatites virais (HBV, HCV, HDV e HEV). No teste sorológico, a presença de anticorpos da classe IgM é fundamental para fazer o diagnóstico (Stapleton *et al.*, 1995).

No diagnóstico, IgM anti-HAV tem sido usada como o principal marcador de infecção aguda (Cuthbert, 2001), composta principalmente de anticorpos contra proteínas do capsídeo. Vários métodos têm sido usados para detectar classes de anticorpos vírus-específicos, incluindo radioimunoensaio (Purcell *et al.*, 1976), ligação imunoquímica (Huang *et al.*, 1979), Ensaio imunoenzimático (ELISA) (Delem, 1992), e imunoblotting (Wang *et al.*, 1996). Os testes de diagnóstico comerciais são ajustados de tal maneira que, apesar dos anticorpos IgM estarem presentes por períodos de tempo após a infecção aguda, a pequena concentração encontrada de quatro a seis meses depois do início da infecção não produz resultado positivo no teste (Stapleton, 1995). O ELISA IgM anti-HAV é disponível comercialmente (Poddar *et al.*, 2002).

Infecções prévias pelo HAV já resolvidas ou mesmo contato do hospedeiro com o vírus são diagnosticadas pela presença de IgG anti-HAV no soro. No entanto,

testes comerciais competitivos detectam anticorpos totais (anticorpos IgG e IgM) circulantes. A associação da presença de anticorpos anti-HAV totais e a ausência de anticorpos IgM anti-HAV pode ser usada para diferenciar entre infecção passada e infecção recente (Nainan *et al.*, 2006).

- **Detecção viral**

O vírus da hepatite A pode ser mantido em vários tipos de células de origem humana e não-humana, incluindo células primárias e secundárias de rim de macaco verde Africano (Daemer *et al.*, 1981) e células de rim de macacos *Rhesus* (FRhK-4) (Flehmg, 1980). Em contraste à maioria dos picornavírus, o HAV de origem humana requer um longo período de adaptação antes de crescer em cultura de células, e uma vez adaptado, produz uma infecção persistente e se tornam atenuados (Feinstone *et al.*, 1983). O HAV replica em cultura celular sem sinais citopáticos de infecção, fato que determina a utilização de testes imunológicos ou moleculares para detectar o vírus em cultura (Siegl *et al.*, 1984). Os métodos comumente usados para quantificar a infectividade são: ensaio de radio imunoensaio (Lemon *et al.*, 1983), ensaio foco fluorescente, radioimunoensaio *in situ* (Siegl *et al.*, 1984), hibridização *in situ* (Jiang *et al.*, 1987), *nested* PCR e PCR em tempo real (de Paula *et al.*, 2009) dentre outros.

As técnicas de detecção do ácido nucléico são mais sensíveis que imunoensaios para detectar o antígeno viral em espécimes clínicas, amostras ambientais, comida e água (de Paula *et al.*, 2004; de Paula *et al.*, 2009). O HAV tem sido detectado com técnicas como polimorfismo de tamanhos de fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (Goswami *et al.*, 1997), polimorfismo conformacional da fita única (SSCP) (Goswami *et al.*, 1997), “Southern blotting” (Buti *et al.*, 2001) e transcrição reversa-PCR (RT-PCR) (Jansen *et al.*, 1990). A amplificação de RNA viral pela RT-PCR é atualmente o método mais sensível e amplamente utilizado para detecção do HAV (Nainan *et al.*, 2006).

O teste quantitativo baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real) revolucionou a detecção de ácidos nucléicos pela sua rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e minimização de contaminantes. Inclusive tem sido aplicado para detecção e quantificação do HAV (Costa-Mattioli *et al.*, 2002a),

utilizado em laboratórios que necessitam liberar resultados rapidamente, como em casos de surtos (Nainan *et al.*, 2006). O sequenciamento dos ácidos nucleicos do genoma do HAV tem sido utilizado para determinar a relação genética dos isolados (Jansen *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1992).

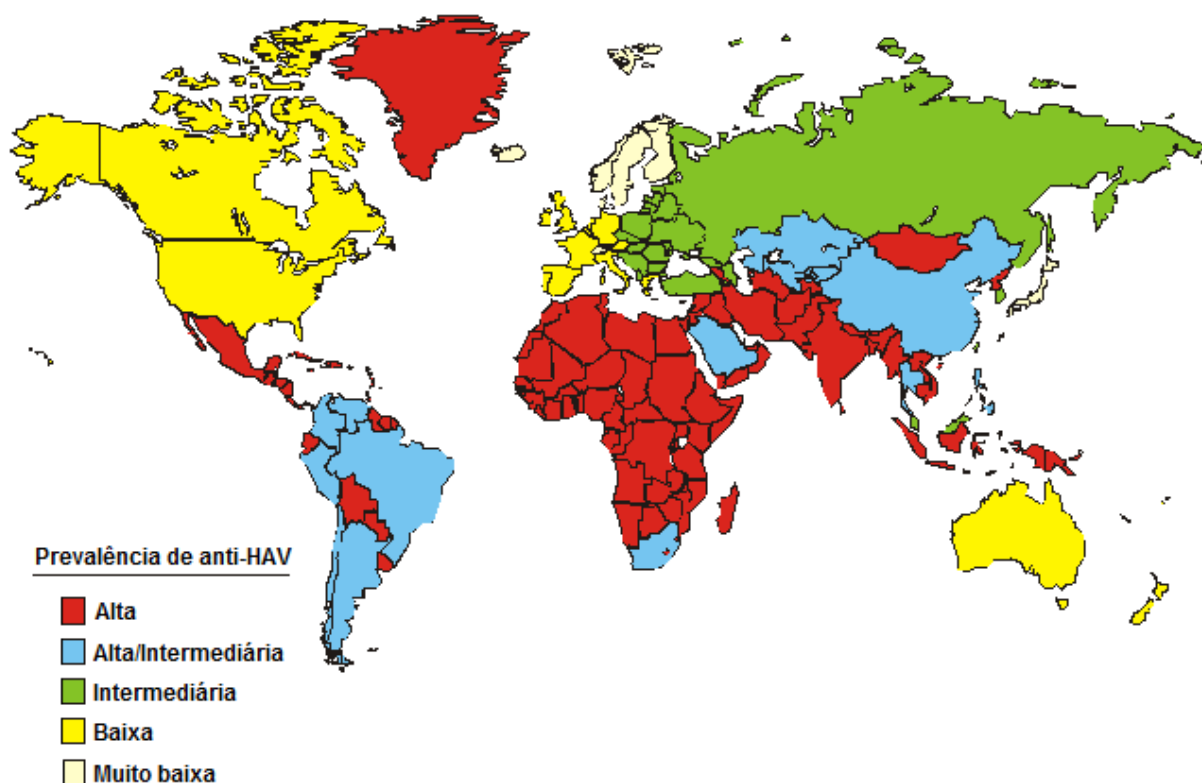
### **1.2.10. Epidemiologia**

Vários padrões de infecção da hepatite A têm sido descritos, variando em relação ao nível de desenvolvimento sócio-econômico (Gust, 1992; Jacobsen *et al.*, 2004) (Figura 1.8). Em áreas com alta endemicidade, o HAV é transmitido principalmente pelo contato pessoa a pessoa, onde 90% das crianças até dez anos já foram infectadas, prevalecendo o curso assintomático e benigno da doença. Esse padrão epidemiológico é típico na África e no Oriente Médio, bem como em alguns países da América Latina e da Ásia (Bell, 2002). Contudo, em alguns países, incluindo o Brasil, as contínuas melhorias das condições sanitárias observadas nos últimos anos, tem ocasionado uma mudança no perfil epidemiológico; tais países passaram de uma condição de alta endemicidade para uma endemicidade intermediária (Vital *et al.*, 2008; FitzSimons., 2010), caracterizada pela diminuição das taxas de soroprevalência (Tanaka, 2000; Kang *et al.*, 2004; Vital *et al.*, 2006). Esta condição, leva a um aumento da susceptibilidade populacional ao vírus, aumentando o risco do surgimento de surtos da doença (Villar *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008) que podem ser de difícil controle (FitzSimons., 2010). Em áreas de endemicidade moderada, a incidência da infecção pelo HAV ocorre com maior frequência no final da infância, adolescência ou em adultos jovens. Nessas áreas, a transmissão ocorre pelo contato pessoa a pessoa ou através do consumo de alimento ou água contaminado.

Em países desenvolvidos, geralmente tem-se uma baixa endemicidade de infecções pelo HAV (Bell *et al.*, 1998; CDC, 1999), ocorrendo majoritariamente entre os adultos jovens (Pham *et al.*, 2005). Tais índices relativamente baixos da doença ao longo da última década, foram conseguidos principalmente devido à vacinação eficiente (Bialek *et al.*, 2004; Wasley *et al.*, 2005) O vírus é transmitido principalmente através do consumo de alimento e água contaminado, entretanto, muitos casos de transmissão pessoa a pessoa tem sido descritos. Nestas áreas, os

surtos também são comuns (Vital *et al.*, 2006). Além disso, casos de infecções esporádicas de pessoas durante viagens para áreas endêmicas são comuns. Todavia, esta continua a ser uma doença frequentemente relatada. Na União Européia, índices da doença vem declinando desde 1995, com menos de 20.000 casos registrados em 2006 (ECDPC, 2008).

A fonte mais comum de infecção é a doméstica ou contatos íntimos com uma pessoa infectada (Bell *et al.*, 1998; CDC, 1999). Outras fontes potenciais de infecções incluem homens que têm relação sexual com homens (apesar de não ter alta prevalência, alguns surtos de hepatite A na Europa e nos Estados Unidos foram associados a esta causa) (Henning *et al.*, 1995; Sundkvist *et al.*, 1997; Bruisten *et al.*, 2001; Nainan *et al.*, 2005), viagens de pessoas de regiões com baixa endemicidade a países onde o HAV é endêmico (Steffen *et al.*, 1994) e uso de drogas ilícitas (Harkess *et al.*, 1989; Grinde *et al.*, 1997). Comida e água contaminadas são fontes pouco frequentes de infecções, entretanto, elas têm sido associadas com surtos (Dienstag *et al.*, 1976; Halliday *et al.*, 1991; Bloch *et al.*, 1990; De Serres *et al.*, 1999; Jothikumar *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2001; Amon *et al.*, 2005). Em raras ocasiões, a infecção pelo HAV é transmitida por transfusão sanguínea ou hemoderivados (Lemon, 1994).



**Figura 1.8: Distribuição geográfica da infecção pelo HAV. (Fonte: Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E - an overview, CDC, 2006)**

### 1.2.11. Prevenção

A disponibilidade de vacinas para prover imunidade por longos períodos contra a hepatite A tem o potencial de reduzir a incidência da doença e a possibilidade de eliminar a transmissão da infecção (CDC, 1999). A eficácia da vacina para hepatite A vem sendo observadas em em vários países. Reduções significantes na incidência da doença têm ocorrido nos Estados Unidos (Wasley *et al.*, 2005) e Israel após a introdução da vacinação de rotina das crianças, com reduções drásticas nas taxas de infecção (Dagan *et al.*, 2005). Ademais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que em países de endemicidade intermediária, onde o HAV representa um problema de saúde pública, que a vacinação em larga escala deve ser considerada um suplemento à melhoria das condições sanitárias (WHO, 2000). No Brasil, a prevenção fica a mercê apenas das melhorias das condições sanitárias, pois a vacina é de alto custo e não disponível no calendário nacional de imunizações (PNI).

## 2. Justificativa

Considerando o contexto epidemiológico no qual o Brasil se insere, onde observa-se um conseqüente aumento de indivíduos adultos jovens susceptíveis a infecção pelo HAV (Vital *et al.*, 2006), torna-se cada vez mais necessário estudos de novas alternativas para o tratamento da doença. Técnicas que visam buscar uma diminuição dos níveis de replicação viral de forma rápida e eficiente tem sido priorizadas, com o objetivo de evitar a evolução da doença.

Neste Contexto, o mecanismo de RNA de interferência surgiu como uma alternativa tecnológica para inibir a expressão gênica, incluindo a replicação viral. Esta técnica pode ser utilizada na tentativa de inibição do ciclo replicativo do HAV. Contudo, devido ao surgimento relativamente recente, alguns padrões de silenciamento por RNA de interferência *in vitro* ainda são variáveis, principalmente para a inibição da replicação viral. Sendo assim, torna-se necessário estudos que buscam o esclarecimento de tais variáveis, como concentração dos agentes de transfecção, tempo de ação, análise do silenciamento, dentre outros. O HAV possui um genoma conservado, é adaptado em cultura celular e possui estratégias de replicação bem caracterizada; devido a estas características pode ser utilizado como um modelo para avaliação de tais variáveis.



## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo Geral**

- Investigar o silenciamento gênico produzido por pequenos RNAs de interferência no ciclo replicativo do vírus da hepatite A.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar se o processo de transfecção interfere na viabilidade celular.
- Estabelecer a concentração de siRNA ideal para garantir um silenciamento efetivo.
- Verificar a internalização de sequências de siRNAs marcadas com fluoróforos.
- Mensurar o grau de silenciamento gênico utilizando três sequências específicas de RNAs de interferência voltadas para as regiões 2C e 3D do genoma do HAV.
- Traçar temporalmente a ação dos RNAs de interferência durante a cinética do HAV em cultura celular.
- Confirmar a inibição da replicação do HAV através da imunofluorescência.

## 4. Material e Métodos

A metodologia utilizada neste trabalho, segue a realizada em outros estudos do gênero (Bhuyan *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009).

### 4.1. Cultura Celular

Células FRhK-4 (Células fetais de rim de macaco *Rhesus* africano), foram cultivadas em meio 199 (Sigma, St. Louis, MO, USA), enriquecidos com soro fetal bovino-SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), a 2% para meio de manutenção e 10% para meio de crescimento, 0,1 $\mu$ M de tampão HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2,5 $\mu$ g/mL de gentamicina (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA), 4% de bicarbonato de sódio (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 0,1mM de aminoácidos não essenciais (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As culturas foram mantidas em garrafas estéreis de 175cm<sup>2</sup> (Corning, New York, NY, USA) a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até o momento do plaqueamento para transfecção. Para o desprendimento da monocamada, as células foram tratadas inicialmente com tampão fosfato-salino (PBS), concentrado 1X, contendo 137 mM de cloreto de sódio (NaCl), 10 mM de fosfato e 2,7 mM de cloreto de sódio (KCl) com pH 7,2, e posteriormente tratada com EDTA/ tripsina a 0,25% (Reagen/GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### 4.2. Sequências de siRNA

Neste estudo foram utilizadas quatro sequências de siRNA. Três sequências específicas para o genoma do HAV, uma para a região 2C do genoma, responsável por codificar a helicase viral, (sequência 2C1) e duas para a região 3D, que codifica uma RNA polimerase RNA dependente (sequências 3D1 e 3D2) que foram descritas previamente por Kanda e colaboradores em 2004 (Tabela 4.1). Além disso, uma sequência não-específica (RNAi#1) foi utilizada como controle negativo. Todas as sequências foram sintetizadas pela Applied Biosystems (Foster city, CA, USA), contudo a sequência RNA#1, é uma sequência comercial que não teve sua combinação nucleotídica revelada.

**Tabela 4.1: Sequências nucleotídicas dos siRNA específicos utilizados descritas por Kanda *et al.*, 2004**

<b>Sequência siRNA</b>	<b>Polaridade</b>	<b>Sequência Nucleotídica</b>	<b>Posição no Genoma</b>
<b>2C1</b>	Sense Antisense	GGUUGAAGUUAACCCUGCUUU UCCAACUUCAAUUUGGACGA	4765-4785
<b>3D1</b>	Sense Antisense	AGCUGAAAUUGAUCCAAUGUU UUUCGACUUUAACUAGGUUAC	6058-6078
<b>3D2</b>	Sense Antisense	GAAACUUGGCAUGACAGCUUU UUCUUUGAACCGUACUGUCGA	7042-7062

### **4.3. Preparo dos oligonucleotídeos específicos (siRNAs)**

As sequências específicas sense e antisense foram adquiridas separadamente, liofilizadas a uma concentração de 20 nanomolar (nmol). As sequências foram ressuspendidas inicialmente em 200µl de água livre de nucleases, a uma concentração final de 100µM cada. Antes da transfecção, as sequências foram diluídas em tampão de hibridização em água livre de nucleases nas concentrações de 1 micromolar (µM), 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM e 35 µM, e hibridizadas por incubação a 90°C por 1 minuto (min), seguido de 37°C por 1 hora, em termociclador (TC-312, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil). Todas as diluições foram realizadas em tubos de poliestireno de 0,5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e armazenadas a -20°C.

A sequência não específica RNA#1 foi adquirida hibridizada a uma concentração inicial de 50µM, sendo diluída a concentração de 2 µM em água livre de nucleases de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.4. Produção viral**

A cepa do HAV utilizada neste trabalho foi isolada no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) (cepa HAF-203 isolado Brasileiro, acesso: GenBank AF268396) (Gaspar *et al.*, 1993; Baptista *et al.*, 2006). Para a propagação do HAV, foram utilizadas células FRhK-4 com 20% a 30% de confluência em garrafas de 175cm<sup>2</sup>. Inicialmente o meio foi

retirado, as garrafas lavadas com PBS 1X e em seguida foram inoculadas com 1,0 mL do HAV ( $1 \times 10^5$  cópias RNA/mL) e incubadas em estufa a 37°C durante uma hora, para adsorção. Posteriormente, o inóculo foi retirado e adicionado 75 mL de meio de manutenção. As garrafas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 11 dias (de Paula *et al.*, 2009). Ao término do tempo de incubação, o meio foi descartado e as células rompidas por cinco ciclos de congelamento e descongelamento em 3,0 mL de PBS pH 7,4 para liberação das partículas virais. O material foi coletado em tubos de poliestireno de 1,5 ml e centrifugado por 10 minutos a 6.000 g, para precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi aliquotado e estocado a -70°C. Uma alíquota foi designada para a quantificação viral por PCR em tempo real que será descrita adiante.

#### **4.5. Transfecção e Ensaio em Placa**

Vinte e quatro horas antes da transfecção, culturas celulares de FRHK-4 com 80% a 90% de confluência foram tripsinizadas e ressuspensas em 40ml de meio de manutenção 199, em seguida, contadas em câmara de Neubaur utilizando azul de tripan a 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA). Aproximadamente  $10^5$  células foram plaqueadas em placas de cultura de vinte e quatro poços (Falcon®/Labware, Franklin Lakes, NJ, USA), em um total de 400µl de meio 199 por poço.

Para a realização da transfecção, foi utilizado o kit comercial siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), que consiste de poliaminas catiônicas que se agregam as sequências de siRNAs facilitando a penetração através da membrana plasmática celular. Seguindo o protocolo do fabricante, 1,0µl do agente de transfecção foi diluído em 25µl de meio OPTIMEM® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente (37°C). Simultaneamente, 1,5µl de cada uma das sequências de RNAi também foram diluídas em 25µl de meio OPTIMEM® e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após este primeiro período de incubação, as sequências diluídas foram misturadas ao agente de transfecção e incubadas por mais 10 mim para a formação dos complexos de transfecção. Durante os períodos de incubação, o meio de manutenção das células já plaqueadas foi retirado e as mesmas lavadas com PBS 1X, em seguida, 2µl dos complexos de transfecção de cada uma das sequências

foram colocados em cada poço. As sequências foram transfectadas isoladamente (2C1,3D1,3D2 e RNA#1) e em suas combinações (2C1+3D1, 2C1+3D2,3D1+3D2 e 2C1+3D1+3D2), e incubadas durante 4 horas em 100µl/poço de meio OPTIMEM<sup>®</sup>. Como controle positivo utilizamos amostras não transfectadas, mas que foram infectadas com HAV como descrito mais adiante. Cada sequência e combinações foram transfectadas em cinco poços. Para cada experimento foi utilizado um total de duas placas.

Após quatro horas, o meio foi retirado e as células novamente lavadas com PBS1X, em seguida, as placas foram infectadas com 20 µl de HAV (10<sup>5</sup> cópias/ml) por poço e incubadas por uma hora para adsorção do vírus à 37°C, após, o vírus foi retirado e as células cultivadas por 5 dias consecutivos em meio de manutenção 199 à 37°C. A cada dia, as células foram lisadas com 350 µl de tampão de lise RLT do kit comercial Qiagen Rneasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). As amostras foram recolhidas em tubos de poliestireno de 1,5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) devidamente identificados e armazenadas a -70°C até o momento da extração do RNA.

Para realização da curva-dose-dependente, a transfecção foi realizada para cada uma das sequências isoladamente nas concentrações de 1µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM e 35 µM e incubadas durante 48 horas, sendo que as concentrações finais transfectadas foram 0,6nM, 3nM, 6nM, 9nM, 12nM, 15nM, 18nM e 21nM, respectivamente. Após, as amostras foram lisadas com 350 µl de tampão de lise RLT do kit comercial Qiagen Rneasy Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA) e armazenadas a -70°C até o momento da extração do RNA.

#### **4.6. Extração do RNA**

Para a extração do RNA, utilizamos o kit comercial Qiagen Rneasy (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo o protocolo para extração de RNA para culturas celulares descrito pelo fabricante. Primeiramente, as amostras já lisadas foram descongeladas e homogeneizadas por um minuto. Em seguida, 350 µl de álcool etílico a 70% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados em cada tubo seguido de homogeneização por um min e transferência de toda a solução para coluna. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 15s em

centrífuga Excelsa II (FANEM, São Paulo, Brasil). Ao fim de cada centrifugação, a solução resultante foi descartada, e o tubo coletor recolocado. Após esta etapa, foi adicionado 700µl do tampão de lavagem *Washer buffer 1* (AW1), seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 15s. A partir de então seguiram-se duas lavagens consecutivas com 500µl de tampão de lavagem RPE, a primeira a 10.000 rpm por 15s e a segunda a 10.000 rpm por 2 min. Ao final desta etapa, os tubos coletores foram descartados e substituídos por tubos de poliestireno de 1,5ml devidamente identificados. Foi adicionado então 50 µl de água livre de nucleases nas colunas que seguiram para uma última centrifugação a 10.000 rpm por 1min para eluição do RNA. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos de poliestireno contendo o RNA viral foram estocados a -70°C até o momento da análise por PCR em tempo real.

#### **4.7. Monitoramento da eficiência de transfecção por intensidade de fluorescência**

Para a confirmação da transfecção, utilizamos duas sequências de siRNA marcadas com fluoróforo FAM (*Silencer<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> GAPDH siRNA* e *Silencer<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> Labeled Negative Control #1 siRNA*, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) e analisamos a intensidade da fluorescência em microscopia de fluorescência. As sequências foram adquiridas a uma concentração inicial de 5 nmol e ressuspendidas em água livre de nucleases a concentração de 30 µM utilizada na transfecção. O plaqueamento e transfecção seguiram a metodologia descrita no item 2.4, contudo lamínulas de vidro redondas de 0,13mm (Labiocenter, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram colocadas nas placas de cultura de 24 poços antes do plaqueamento. Cada sequência foi transfectada em triplicata e as amostras não transfectadas foram utilizadas como controle negativo.

Após 4 horas de transfecção, o meio de manutenção foi retirado e as células de cada poço foram lavadas com PBS 1X (pH 7,2). Antes do início de cada procedimento de fixação, permeabilização e bloqueio das células, houve o preparo dos reagentes a serem utilizados. Para a fixação das culturas celulares, utilizamos o paraformaldeído (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA) diluído a uma concentração de 4% em PBS 1X (pH 7,2) com 25 µl de hidróxido de sódio-NaOH (Sigma, St. Louis,

MO, USA) a 5M, a solução foi levada ao banho maria a 65°C (Precision, Winchester, VI, USA) por cerca de 10 min para total dissolução do paraformaldeído, após, a solução foi resfriada a temperatura ambiente. Para a permeabilização, utilizamos a solução de triton X-110 (Sigma, St. Louis, MO, USA) a concentração de 0,1%, e para o bloqueio, usamos uma solução de Albumina Bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 3%, ambos diluídos em PBS 1X (pH 7,2).

Sendo assim, foram colocados 400 µl de paraformaldeído/PBS por poço, seguido de incubação por 7 min a temperatura ambiente sob leve agitação manual para fixação das células. Posteriormente, o paraformaldeído foi retirado e as células novamente lavadas com PBS 1X. Após, foi adicionado 500 µl da solução de Triton X-110 e as células incubadas por mais 7 min a temperatura ambiente sob leve agitação manual para permeabilização das membranas celulares. A solução de Triton X-110 foi retirada e as células novamente lavadas com PBS 1X. Então, as células foram bloqueadas com a solução de BSA por 1 hora com agitação manual a cada 15 min. Ao final, a solução de bloqueio foi retirada e as células lavadas com PBS 1X. As lâminas então, foram retiradas do poço e colocadas em lâminas (Superfrostplus/Easypath, São Paulo, SP, Brasil), com cerca de 3 µl de “Slow Fade<sup>®</sup>” em glicerol com marcação DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindole-Invitrogen, Eugene, OR, USA), para dar coloração azulada ao núcleo celular. As lâminas seguiram para uma análise inicial em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E400 (NIKON, El Segundo, CA, USA) e posteriormente para uma análise final em microscópio confocal LSM Zeiss Meta (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

#### **4.8. Medição da viabilidade celular por (sódio 3'-[1-(fenilaminocarbonil)- 3,4- tetrazólio]) (XTT)**

Para análise da porcentagem de células que permaneceram viáveis após o processo de transfecção química realizada com o kit comercial siPORT<sup>™</sup> Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando XTT (sódio 3'-[1-(fenilaminocarbonil)- 3,4- tetrazólio]) (Botium, Hayward, CA, USA).

Vinte e quatro horas antes da transfecção, culturas celulares de FRHK-4 com 80% a 90% de confluência foram tripsinizadas e ressuspensas em 40ml de meio de

manutenção 199, em seguida, contadas em câmara de Neubaur utilizando azul de tripan a 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA). Aproximadamente  $10^4$  células foram plaqueadas em 100µl de meio 199 em placas de cultura de 96 poços (Falcon®/Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Após 24 horas, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS1X. Duas colunas permaneceram com apenas a cultura celular (controle positivo), duas foram infectadas com o HAV ( $1 \times 10^5$  cópias RNA/mL), duas transfectadas seguindo a metodologia descrita no item 4.5, contudo utilizamos apenas a sequência 2C1 e as duas restantes foram transfectadas somente com o kit comercial siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA kit). As placas então foram armazenadas a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> por 5 dias. Após, 6,25µl de reagente de ativação foi misturado a 1,25ml de solução de XTT, em seguida, 25µl da solução de XTT ativada foi distribuída em cada poço, as placas foram armazenadas durante 4 horas em ambiente pouco iluminado. Ao final, a densidade ótica das células foi avaliada pelo uso do espectrofotômetro multiskan com filtro entre 450nm e 620nm (Organon Teknika, Farnham Drive, Dublin, Irlanda). A análise foi realizada estabelecendo as diferenças entre as médias das densidades óticas (D.O) das amostras não transfectadas em relação às amostras transfectadas.

#### **4.9. Imunofluorescência**

Para a confirmação do silenciamento, realizamos a imunofluorescência para o HAV em amostras transfectadas com as sequências descritas no item 4.2, seguindo a metodologia descrita no item 4.7, com exceção da inserção de lamínulas de vidro redondas de 0,13mm (Labiocenter, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) colocadas antes do plaqueamento. Todas as sequências e combinações de sequências foram transfectadas em duplicata e incubadas durante 48 horas após a infecção com o HAV.

Após quarenta e oito horas, o meio de manutenção foi retirado e as células lavadas com PBS 1X, procedimento este que foi realizado ao final de cada etapa. A fixação foi realizada com 400µl de paraformaldeído/PBS a 4% (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA) em cada poço, incubados por 7 min sob leve agitação. As células então foram permeabilizadas com 500 µl da solução de Triton X-110 a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) por poço também durante 7 min sob leve agitação e em



seguida bloqueadas com solução de BSA a 3% (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1h com agitação manual a cada 15 min. Após a etapa de bloqueio, as células foram incubadas durante 1h com 40 µl/poço de anticorpo anti-HAV IgY produzido em galinhas (0,1mg/ml), utilizado com anticorpo primário na diluição de 1:30 produzido em nosso laboratório, onde estudos preliminares já demonstraram que tal anticorpo possui uma maior eficiência com relação ao anticorpo anti-HAV comercial (Amado *et al.*, 2010). Ao final, as células foram incubadas por mais 1h com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-IgY produzido em cabras (2mg/ml) (Molecular Probe, Eugene, OR, USA), na diluição 1:300. As lamínulas então, foram retiradas do poço e colocadas em lâminas (Superfrostplus/Easypath, São Paulo, SP, Brasil, com cerca de 3 µl de “Slow Fade<sup>®</sup>” em glicerol com marcação DAPI (4’6-diamidino-2-fenilindole -Invitrogen, Eugene, OR, USA) para dar coloração azulada ao núcleo celular. As lâminas seguiram para uma análise inicial em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E400 (NIKON, El Segundo, CA, USA) e posteriormente para uma análise final em microscópio confocal LSM Zeiss Meta (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

#### **4.10. PCR em tempo real**

A quantificação do HAV RNA das amostras já extraídas foram analisadas utilizando duas metodologias de PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. Para ambas as metodologias utilizamos o kit TaqMan<sup>®</sup> EZ CORE reagents (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) em concentrações descritas na tabela 4.2. A solução foi distribuída em placas de 96 poços (Falcon<sup>®</sup>/Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) em um volume de 20 µl/poço e posteriormente foi adicionado 5 µl do HAV RNA por poço. As amostras foram analisadas em duplicata.

**Tabela 4.2: Volume dos reagentes do kit EZ CORE reagents.**

Reagentes	Volume ( $\mu$ l) por poço
Rnase free water	3.75
5X Taqman Ex Buffer	5
Mangense acetato (25mM)	4
dATP (10mM)	1
dCTP(10mM)	1
dGTP(10mM)	1
dUTP(20mM)	1
Assay (Sonda + primers) (20U/ul)	1
Primer antisense (3 $\mu$ g/ul)	1
Rth DNA Polimerase (2,5U/ul)	1
Amp Erase UNG (1U/ul)	0.25

#### 4.10.1. Quantificação Absoluta

O Assay utilizado era composto por oligonucleotídeos específicos para a região 5' não-codificante do genoma do HAV (oligonucleotídeo sense: 5'-CTGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC-3', oligonucleotídeo antisense: 5'-GAGACCCTGGAAGAAAGAAGA-3') juntamente com uma sonda específica marcada com fluoróforo FAM (FAM-5'-ACTCATTTTTTCACGCTTTCTG-3') que foram desenhadas e descritas previamente por de Paula e colaboradores em 2007.

As reações foram processadas usando o equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Inicialmente as amostras foram submetidas à temperatura de 50°C por 2 min para ativação da UNG (Uracil N-glicosilase), em seguida a 60°C por 30 min para formação do DNA complementar (cDNA) e depois a 95°C por 5 min para desativação da UNG. Após, seguiram-se 40 ciclos de 94°C por 20 seg. para desnaturação das fitas e 62°C por 1min para anelamento e extensão das fitas. A fluorescência foi detectada ao final de cada etapa de hibridização da sonda. O valor de  $C_T$  (*threshold cycle*) foi fornecido automaticamente em cada corrida.

Para análise de quantificação absoluta, foi utilizada uma curva padrão a partir de um clone recombinante da região 5' não-codificante do genoma do HAV (cepa

HAF-203), quantificado em espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) (de Paula *et al.*, 2007). O clone recombinante foi submetido a diluições seriadas de 10 log para geração dos pontos da curva padrão como mostrado na figura 4.1.

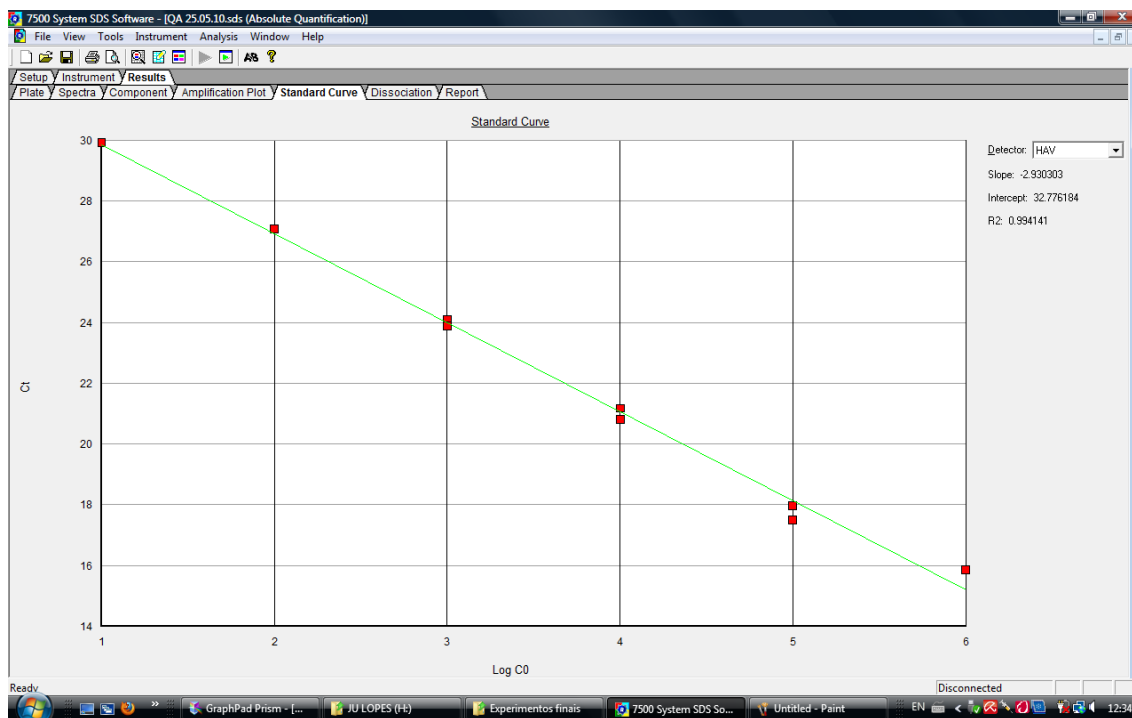


Figura 4.1: Curva Padrão do HAV para análise de Quantificação Absoluta.

#### 4.10.2. Quantificação Relativa

Para a quantificação relativa, foi utilizado o kit TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) como controle endógeno. O volume dos reagentes utilizados foi o mesmo descrito na tabela 2, contudo o assay foi substituído pelo proveniente do kit mencionado acima.

A quantificação relativa realiza uma comparação entre os *CTs*, tendo o controle endógeno como normalizador da reação, sendo assim, os resultados foram analisados baseados na metodologia do  $\Delta\Delta CT$  comparativo. Nesta metodologia, cada amostra (transfectada e não transfectada) é quantificada tanto para o HAV quanto para o controle endógeno, e a diferença entre os valores de *CTs* gerados para ambos os alvos, dará os valores de  $\Delta\Delta CT$ . No caso do estudo realizado, foi gerado uma amostra calibradora (amostra transfectada não infectada) por dia de

infecção neste realizada, sendo este o controle positivo. Os valores finais para análise (RQ) com os devidos valores de desvio padrão foram gerados automaticamente ao final de cada corrida e a porcentagem de silenciamento *knockdown* foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de silenciamento} = 100 - 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ (RQ)}$$

Todas as amostras geradas foram analisadas segundo o calibrador de cada dia com amostra não transfectada infectada.

Um controle endógeno ideal seria aquele que não apresenta grandes variações de quantificação entre as amostras tratadas e não tratadas. Com isso, para padronizar o controle endógeno utilizado, fizemos a diferença entre as médias dos *CTs* das amostras transfectadas em relação às amostras não transfectadas utilizando os reagentes do controle endógeno. De acordo com a tabela 4.3 demonstrada abaixo, não houve grandes variações entre as amostras analisadas, considerando o controle endógeno utilizado como ideal para análise de quantificação relativa.

**Tabela 4.3: Média dos *CTs* das amostras transfectadas e não transfectadas para o controle endógeno utilizado.**

	Média dos <i>CTs</i> das amostras transfectadas	Média dos <i>CTs</i> das amostras não transfectadas
RNA ribossomal	15.526	15.410

#### 4.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa “GraphPad Prism” 5.0. Os dados foram relatados como média ± desvio padrão (DP) e os níveis de significância foram avaliados utilizando ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1. Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular após o processo de transfecção, foi realizada a metodologia de XTT, através dos cálculos das médias da densidade ótica (D.O.) das amostras após cinco dias de cultivo. Considerando os poços que continham apenas células, a média da D.O. foi de 0.846nm. Esta média foi utilizada como referência admitindo-se como 100% de células viáveis para efeito comparativo. Sendo assim, as células infectadas pelo HAV (não-transfectadas) obtiveram uma média da D.O. de 0,780 (90,13%) com desvio padrão de 4,065. Já as células infectadas e transfectadas, obtiveram uma média de D.O. de 0.621 (73,40%), o que caracteriza uma redução de 26,6% na viabilidade celular após cinco dias. O desvio padrão deste grupo foi de 2,427. Os resultados apresentam significância estatística, uma vez que  $p < 0,0001$  em relação ao meio contendo somente células (Figura 5.1).

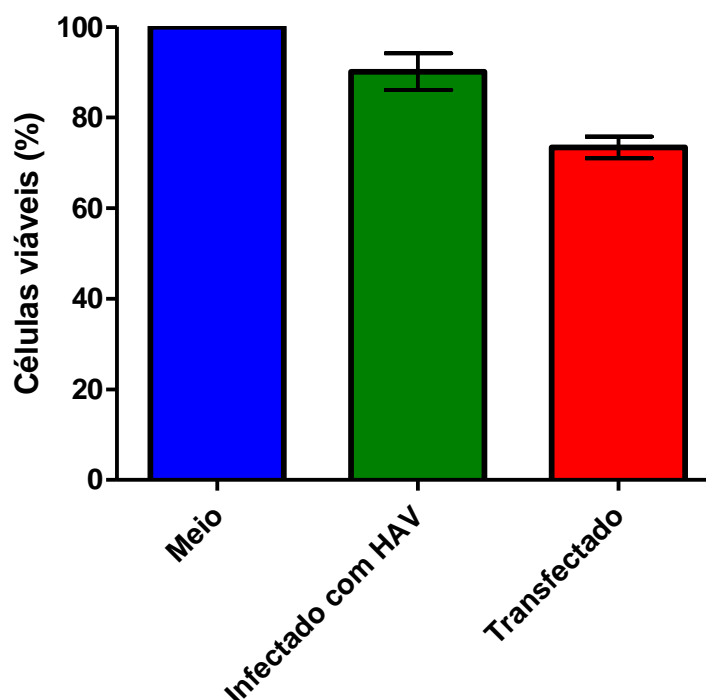


Figura 5.1: Porcentagem de células que permaneceram viáveis cinco dias após o processo de transfecção (valor médio)

## 5.2. Curva Dose-Dependente

Para avaliar a melhor concentração de siRNA para inibir a replicação do HAV foi estabelecida uma curva dose-dependente para cada uma das sequências analisadas, quarenta e oito horas após a transfecção pelo método de quantificação absoluta em PCR em tempo real. Foram utilizadas as concentrações de 0,6nM, 3nM, 6nM, 9nM, 12nM, 15nM, 18nM e 21nM. A concentração que obteve o maior grau de silenciamento para as três sequências utilizadas foi 18nM, em relação ao controle positivo. A concentração de 21 nM apresentou uma diminuição da atividade de silenciamento. Abaixo segue a tabela com a média das quantificações absolutas da curva-dose das sequências analisadas (Tabela 5.1). A partir destes resultados a concentração de 18 nM foi utilizada para os estudos de silenciamento (Figura 5.2).

**Tabela 5.1: Média da Quantificação Absoluta das concentrações utilizadas para estabelecer a curva-dose dependente após 48 horas de transfecção.**

Concentração final (nM)	Média da Quantificação Absoluta (cópias de RNA viral/ml)				Controle Negativo da Transfecção	Controle Positivo
	siRNA 2C1	siRNA 3D1	siRNA 3D2			
0,6	$1,3 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$			
3	$1,1 \times 10^5$	$7,7 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$			
6	$6,7 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$			
9	$4,4 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$			
12	$4,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	
15	$6,7 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^0$			
18	$2,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$			
21	$1,2 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$	$8,1 \times 10^4$			

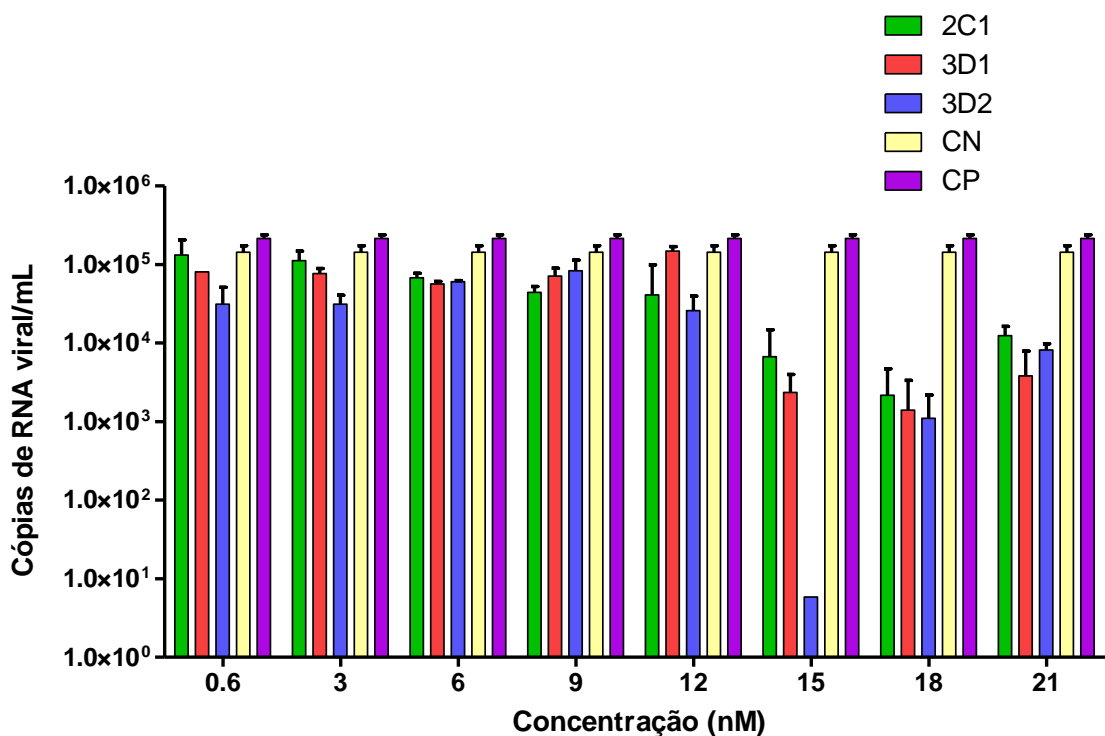


Figura 5.2: Curva-dose dependente das sequências de siRNAs utilizadas 48 horas pós-transfecção.

### 5.3. Monitoramento da eficiência de transfecção por intensidade de fluorescência

Para avaliar se o processo de transfecção estava ocorrendo de forma eficiente, culturas celulares foram transfectadas com as sequências *Silencer*<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> GAPDH siRNA e *Silencer*<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> *Labeled Negative Control* #1 siRNA que emitem fluorescência quando excitadas. Para o monitoramento foi utilizada a metodologia descrita anteriormente com 4 horas pós-transfecção. Na figura 5.3 (A), são mostradas as células não transfectadas (controle). Nas figuras 5.3 (B) e 5.3 (C) são mostrados células transfectadas com *Silencer*<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> GAPDH siRNA e *Labeled Negative Control* #1 siRNA, respectivamente. Em tais figuras é possível visualizar os complexos fluorescentes no citoplasma celular, que possivelmente demonstra que as sequências são internalizadas de forma eficiente com o kit de transfecção utilizado, quatro horas após a transfecção.

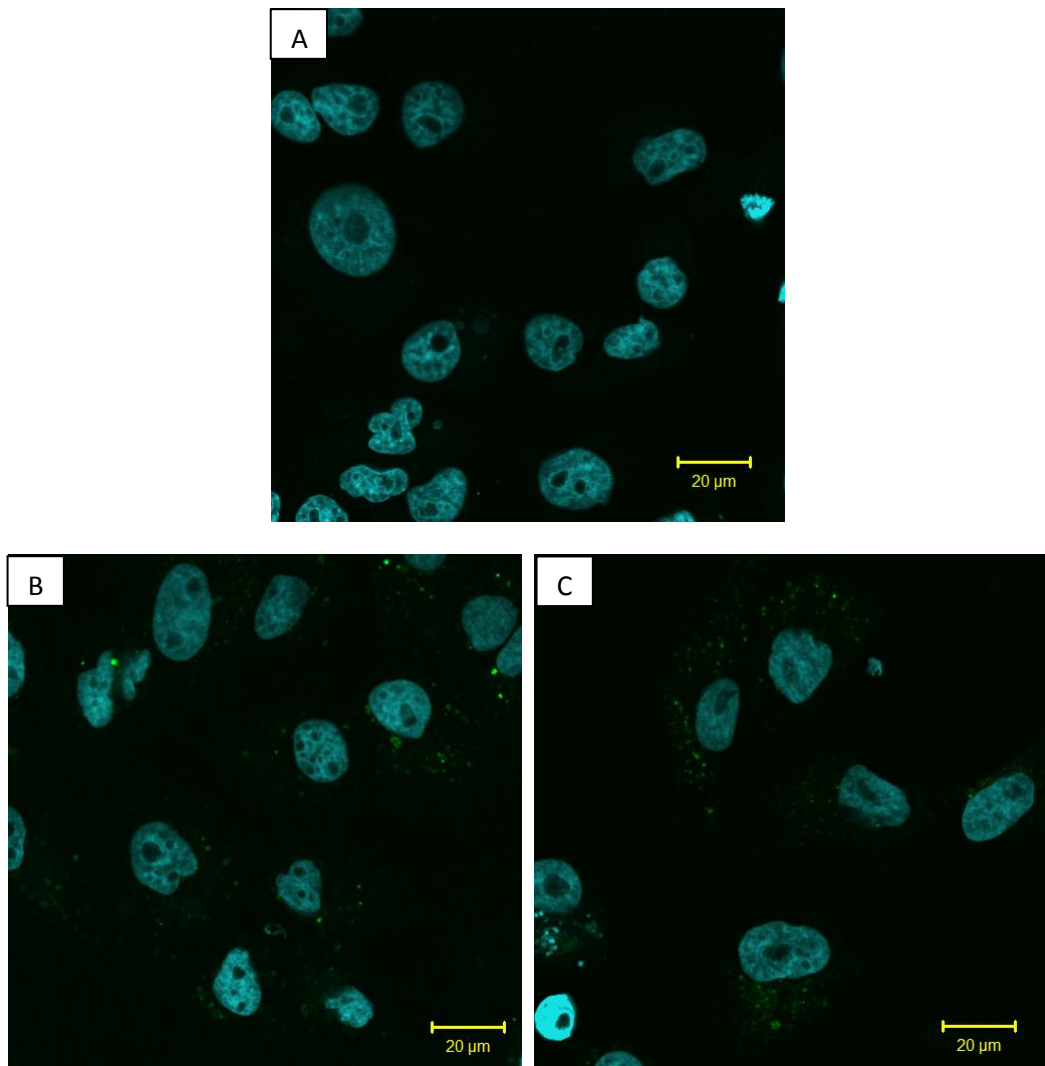


Figura 5.3: Em A, célula não transfectada (controle). Em B, célula transfectada com *Silencer<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> GAPDH siRNA* e em C, célula transfectada com *Silencer<sup>R</sup> FAM<sup>TM</sup> Labeled Negative Control #1 siRNA* 4 horas após a transfecção (Aumento de 63X).



## 5.4. Silenciamento

A avaliação do silenciamento gênico produzido pelos siRNAs utilizados no ciclo replicativo do HAV foi analisada para todas as sequências específicas e não específicas, admitindo-se como controle positivo (ou amostra calibradora) amostras infectadas não transfectadas de cada um dos cinco dias analisados. Todas as amostras foram comparadas relativamente ao controle positivo e normalizadas pelo controle endógeno. Com isso, avaliamos a porcentagem de replicação remanescente e, conseqüentemente, o grau de silenciamento produzido pelas sequências isoladamente e suas combinações.

No gráfico referente à análise do 1º dia pós-infecção de todas as seqüências utilizadas (Figura 5.6), observa-se que as sequências utilizadas de forma isolada já garantem uma redução dos níveis de replicação viral superior a 50%. As células transfectadas com a seqüência 2C1 isoladamente, tiveram um remanescente de replicação de 47,2% e conseqüentemente um silenciamento de 52,8% com relação às células infectadas não transfectadas (controle positivo-CP). Com relação à seqüência 3D1, encontramos um remanescente de replicação de 34,1% e conseqüentemente um silenciamento de 65,9% com relação ao controle positivo. Já a seqüência 3D2, temos 78,7% de silenciamento. Das três seqüências analisadas isoladamente, a 3D2 foi a que apresentou a maior inibição da replicação em 24 horas pós-infecção. Com relação às combinações analisadas, quando transfectamos com 2C1 + 3D1 o silenciamento foi de 57,5%. Para 2C1 + 3D2, o valor foi de 79% e para 3D1 + 3D2 encontramos 64,6% de silenciamento. A combinação 2C1 + 3D2 foi a que apresentou os melhores resultados em 24 horas de pós-infecção. Quando transfectamos com as três seqüências juntas, temos apenas 29,8% de remanescente de replicação com 70,2% de silenciamento. O controle negativo obteve menos de 1% de remanescente de replicação com relação ao CP. Estes resultados demonstram que o silenciamento já ocorre desde o primeiro dia de infecção, mesmo considerando que em 24 horas os níveis de replicação ainda são baixos.

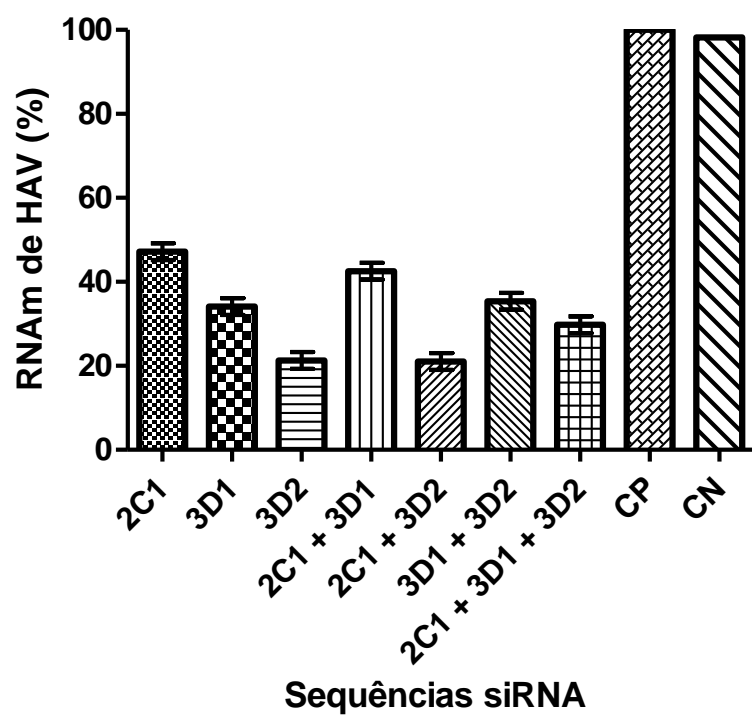


Figura 5.6: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 1° dia pós-infecção.

Com relação ao segundo dia de replicação (Figura 5.7), observa-se que o silenciamento continua ocorrendo acima de 50%, tanto no tratamento isolado, quando nas combinações dos siRNAs. A sequência 2C1 apresentou um remanescente de replicação de 39,7% e silenciamento de 60,3%. Já as sequências 3D1 e 3D2, isoladamente, e a combinação 2C1 + 3D2 tiveram um silenciamento de 55,1%, 71,8% e 63,2% respectivamente. As combinações restantes, 2C1+3D1, 3D1+3D2 obtiveram 71,8% e 71,2%, respectivamente, de inibição da replicação viral. A combinação 2C1+3D1+3D2 teve um silenciamento de 85,3% com apenas 14,7% de remanescente de replicação. Este foi o melhor silenciamento observado em relação a todas as sequências em todos os dias analisados. Esses resultados demonstram que a inibição com os siRNAs continuam ocorrendo em 48 horas pós-infecção.

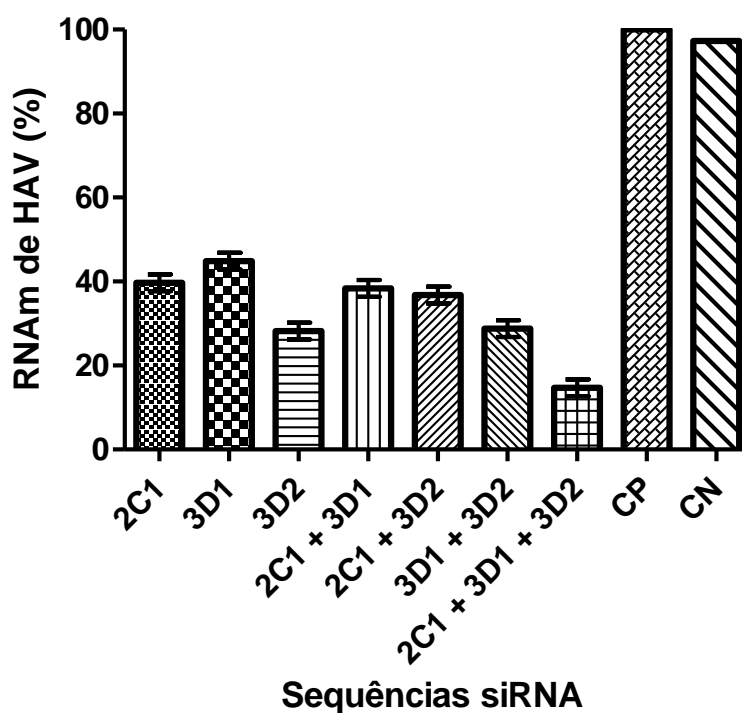


Figura 5.7 : Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 2º dia pós-infecção.

A partir do terceiro dia pós-infecção (Figura 5.8), ainda ocorre o silenciamento da replicação superior a 50% para a maioria das sequências, contudo, o poder de inibição decai para a maioria dos siRNAs com relação aos dias anteriores. A sequência 2C1 permanece com a mesma taxa de 60,3% de silenciamento. As sequências 3D1 e 3D2 obtiveram um decaimento do poder de inibição, com 41,1% e 66,6% de silenciamento. As quatro combinações restantes também apresentaram decaimento do poder de inibição, com 47,7%, 49,5%, 62,2% e 75,4% de silenciamento, respectivamente, ambos em relação ao 2º dia pós-infecção.

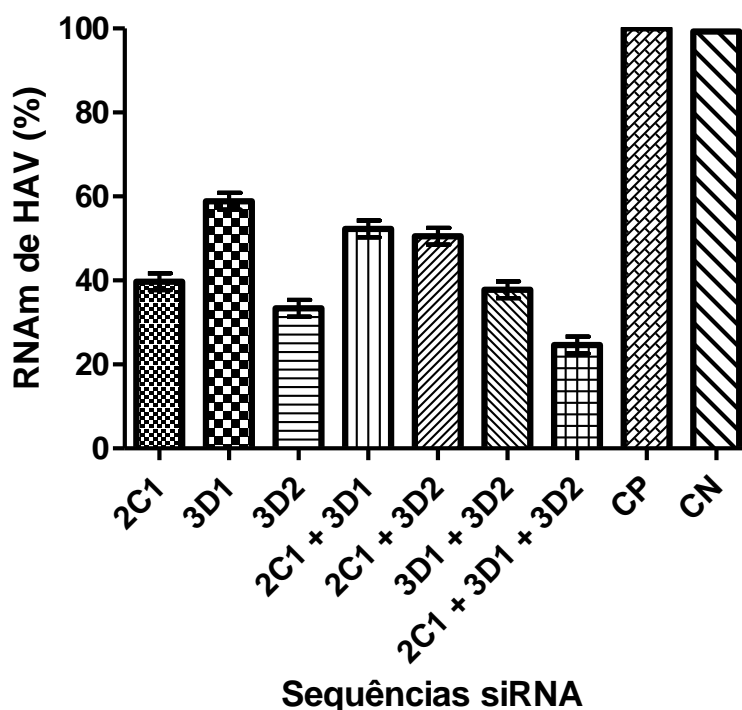


Figura 5.8: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 3º dia pós-infecção

No quarto dia de pós-infecção, observa-se um decaimento da inibição da replicação pelos siRNAs. A sequência 2C1 teve uma pequena perda do potencial de inibição, com 57,7% de silenciamento. A sequência 3D1 teve 23,8% de silenciamento, enquanto que a sequência 3D2 obteve 59,8% de silenciamento. As combinações obtiveram 30,8%, 32,4%, 48,8% e 54,4% de silenciamento para 2C1+3D1, 2C1+3D2, 3D1+3D2, 2C1+3D1+3D2, respectivamente. Apesar do decaimento do potencial inibitório, 2C1 e 3D2, juntamente com 2C1+3D1+3D2, ainda conseguem manter o silenciamento em mais de 50% em relação ao controle positivo. Abaixo segue o gráfico referente à análise do 4º dia pós-infecção de todas as seqüências utilizadas.

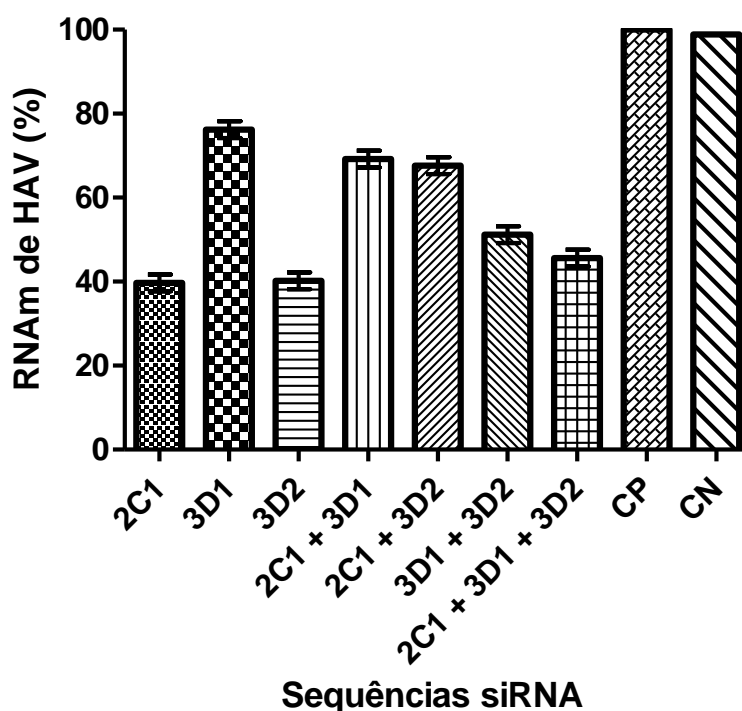
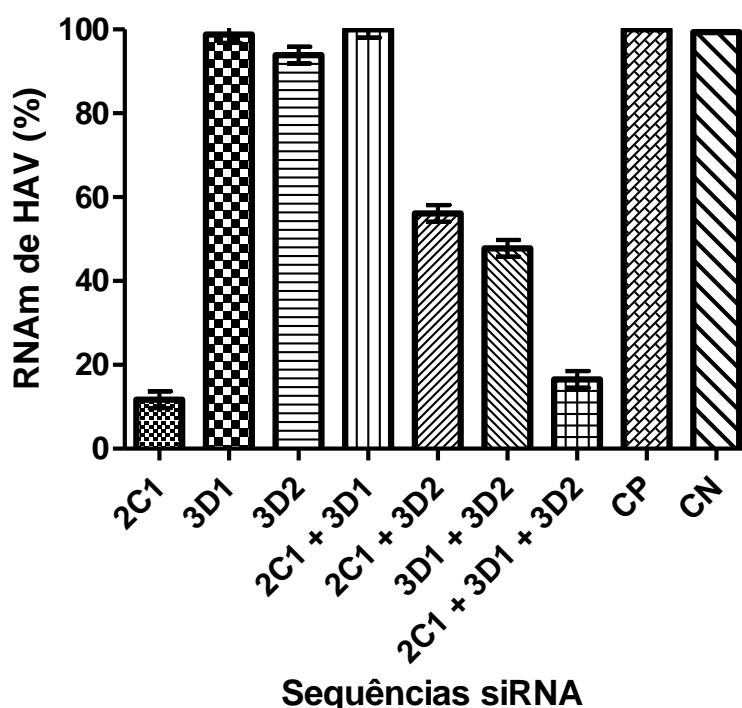


Figura 5.9: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 4º dia pós-infecção.

Nos resultados referentes ao 5º dia de pós-infecção (Figura 5.10), observou-se que as sequências 3D1 e 3D2 tiveram um silenciamento de 1,2% e 6,1%, respectivamente. Já as sequências 2C1, 2C1+3D2, 3D1+3D2 e 2C1+3D1+3D2 tiveram um silenciamento de 88,3%, 56,1%, 47,8% e 16,5%, respectivamente. A combinação 2C1+3D1 não obteve nenhum silenciamento.



**Figura 5.10: Análise de Quantificação relativa do RNAm viral no 5º dia pós-infecção**

Na Figura 5.11, temos a comparação do silenciamento medido por todas as sequências e combinações durante os cinco dias de infecção. De forma geral, observou-se que a sequência 2C1 apresenta bons níveis de silenciamento tanto em relação à inibição direta da replicação, como em relação à permanência da inibição durante os 5 dias analisados. Tal sequência inibe a helicase viral.

As sequências 3D1 e 3D2 tiveram um decréscimo do potencial de inibição com o passar dos dias. A diferença entre elas é a região do RNA mensageiro da

proteína 3D do HAV que será degradada, contudo podemos observar que a sequência 3D2 consegue ter um potencial inibitório maior que a sequência 3D1. A combinação 2C1+ 3D1, de forma geral, também apresentou um decaimento da ação com o passar dos dias, com exceção do 2º dia onde ocorreu um aumento. A combinação 2C1+3D2 diminuiu a capacidade inibitória com o passar dos dias, contudo obteve um aumento do silenciamento ao 5º dia. Na combinação 3D1 + 3D2, ressaltando que são duas sequências distintas para a mesma proteína 3D do HAV, temos um padrão relativamente semelhante ao anterior, contudo ocorre um aumento do silenciamento ao 2º dia e 5º dia em relação aos dias que antecedem. Quando a ação das 3 sequências foi analisada em conjunto durante os 5 dias, observamos que estes são os maiores níveis de silenciamento encontrados, com remanescentes de replicação viral abaixo de 50% em todos os dias e abaixo de 30% em 4 dias.

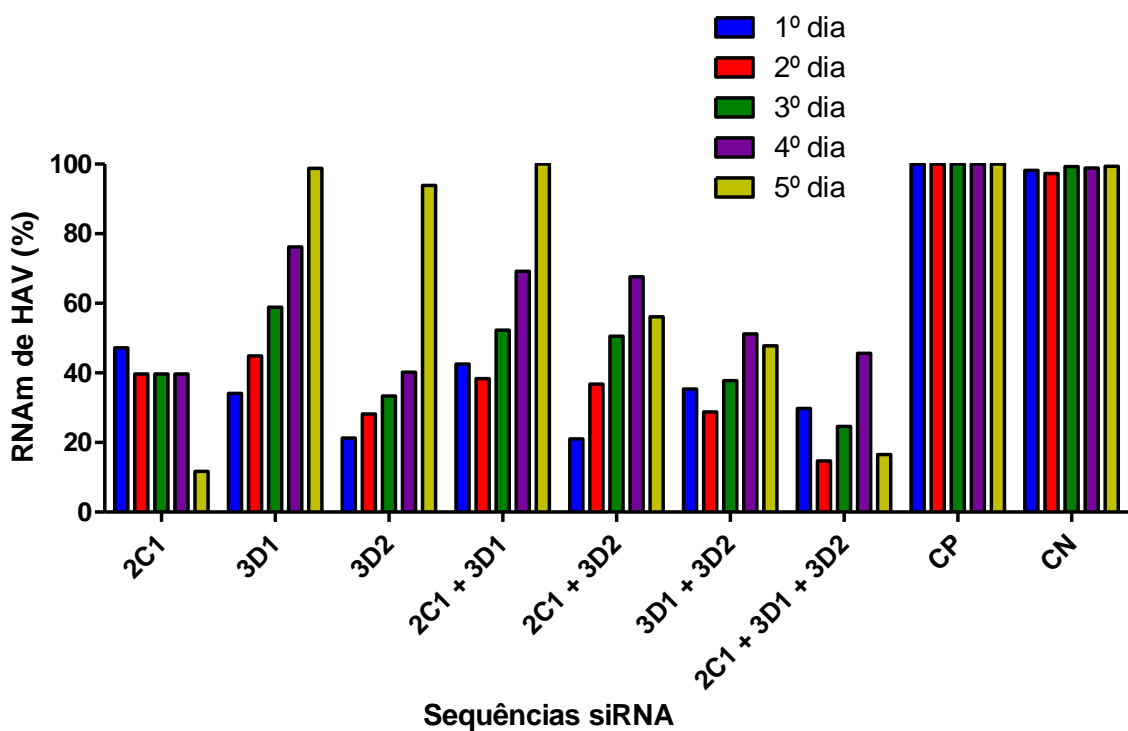


Figura 5.11: Porcentagem de inibição de todas as sequências nos 5 dias analisados.

## 5.5. Imunofluorescência para HAV

Para confirmação do silenciamento gênico observado na análise feita pelo PCR em tempo real, foi realizada imunofluorescência para o HAV em células tratadas com as sequências de siRNAs de forma isolada ou combinada, quarenta e oito horas após a transfecção, onde são encontrados os melhores índices de silenciamento para a maioria das sequências no PCR em tempo real.

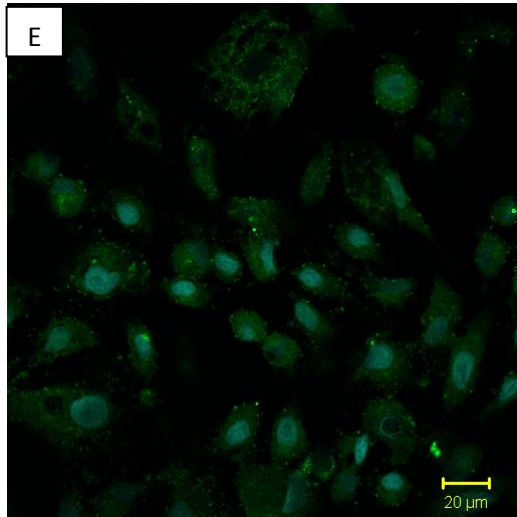
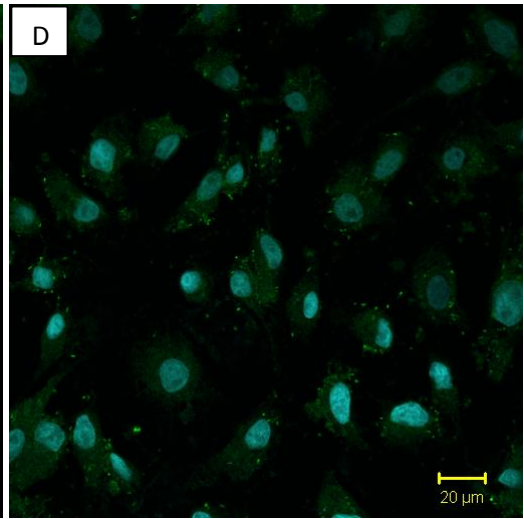
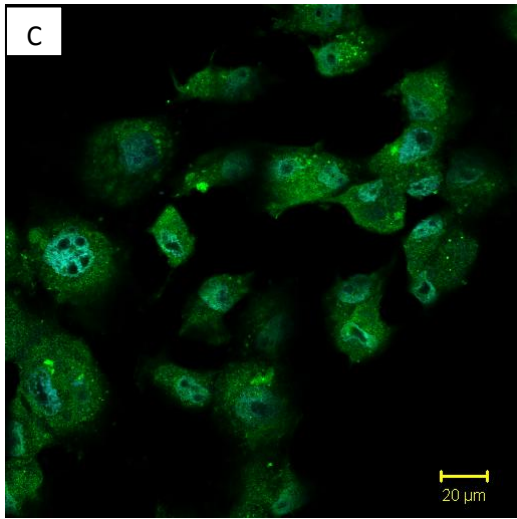
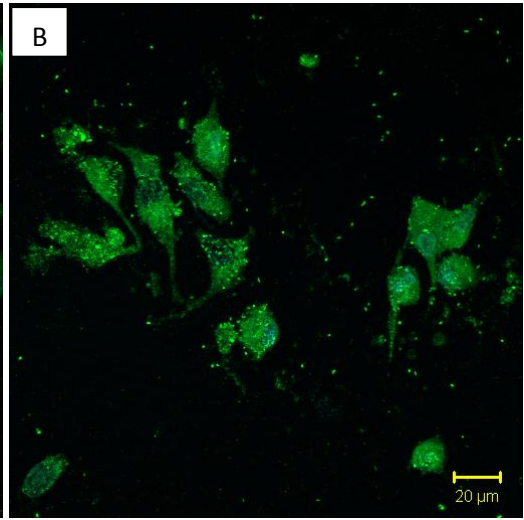
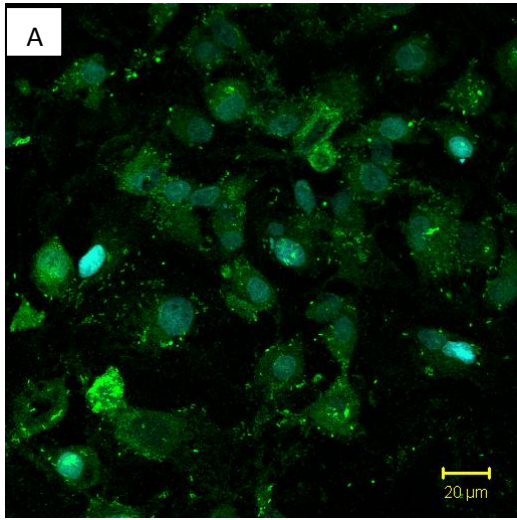
Na figura 5.12 (A), estão representados células não transfectadas (controle positivo), que demonstra uma fluorescência verde intensa dispersa pelo citoplasma e a marcação do núcleo celular em azul. Na figura 5.12 (B), são células transfectadas com a sequência controle negativa RNA#1, mostrando ainda um padrão de uma fluorescência verde intensa demonstrando que tal sequência aparentemente não influencia na intensidade de fluorescência, que poderiam caracterizar efeitos de silenciamento inespecífico para o HAV.

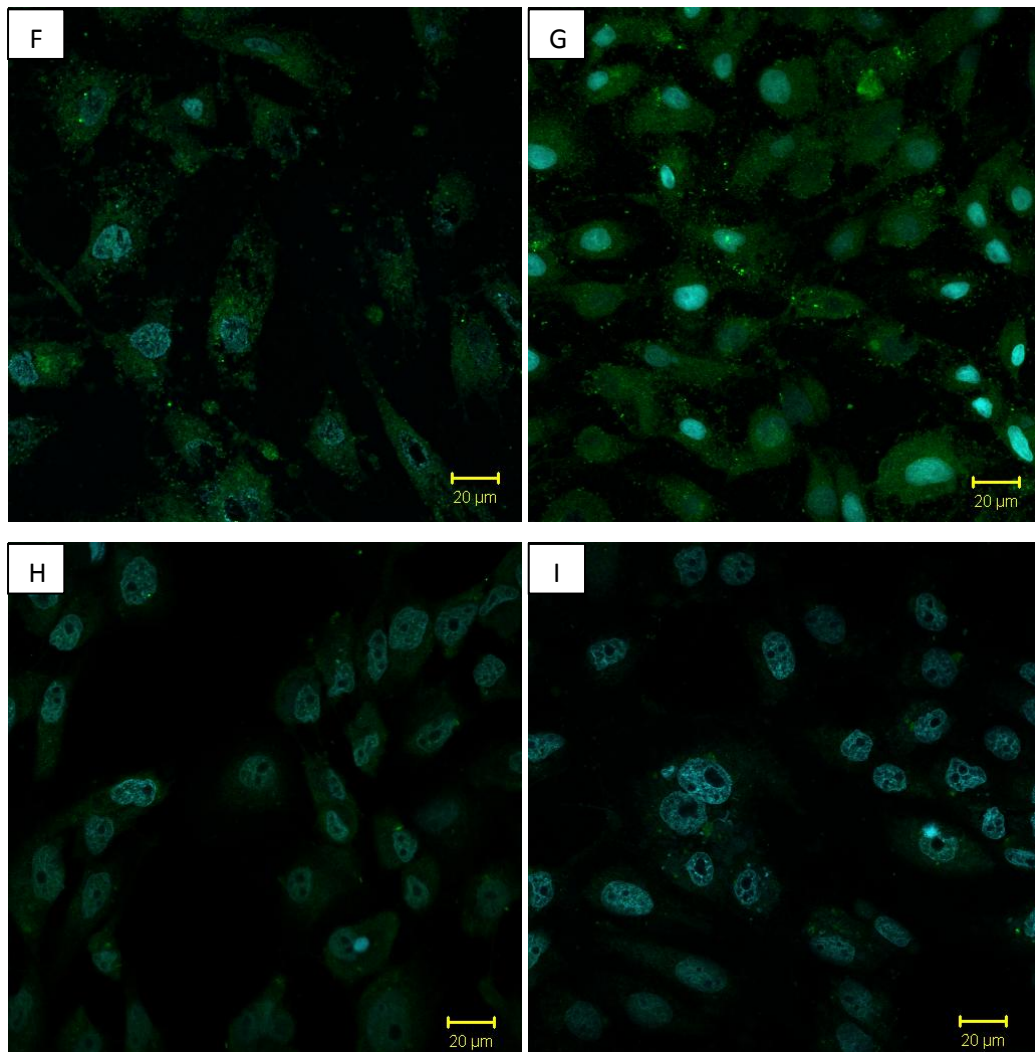
A figura 5.12 (C) apresenta células transfectadas com a sequência 2C1 isolada, que parece ter uma diminuição da fluorescência muito tênue. A figura 5.12 (D), observou-se uma diminuição perceptível da fluorescência nas células, tratadas com a sequência 3D1, e na figura 5.12 (E), onde as células foram tratadas com a sequência 3D2, também podemos observar uma diminuição da fluorescência, contudo ela parece visualmente ser menor que a observada para a sequência 3D1.

Nas figuras 5.12 (F), 5.12 (G) e 5.12 (H), as células foram tratadas respectivamente com as combinações 2C1+3D1, 2C1+3D2 e 3D1+3D2, que parecem ter intensidades de fluorescência semelhantes, contudo menor que o controle positivo, definindo provavelmente uma inibição intermediária em relação às sequências isoladas e as 3 sequências juntas. Finalmente, a figura 5.12 (I), demonstra uma considerável diminuição da intensidade de fluorescência com relação ao controle positivo, caracterizado por um silenciamento resultante das combinações das três sequências juntas.

A quantificação da fluorescência para correlação com os dados do PCR em tempo real serão feitos posteriormente.







**Figura 5.12:** Em A, células não transfectadas (controle positivo), em B, células transfectadas com a sequência controle negativa RNA#1, em C, D e E células transfectadas com a sequência 2C1,3D1 e 3D2 respectivamente. Em F, G, H, I, células transfectadas com as combinações 2C1+3D1, 2C1+3D2, 3D1+3D2 e 2C1+3D1+3D2, respectivamente (Aumento 63X).

## 6. Discussão

Já foi observado que a infecção de cultura celular em cepas do HAV raramente causa efeito citopático aparente (Flehmg *et al.*, 1981), mesmo quando a infecção é persistente (Provost *et al.*, 1979). Com relação às porcentagens encontradas de viabilidade celular, como esperado as células não tratadas e não infectadas não apresentaram alteração de viabilidade após cinco dias de cultivo, assim como as infectadas pelo HAV. Todavia, com relação ao kit de transfecção utilizado, podemos observar uma redução de 24,5% no índice de viabilidade celular no tempo analisado, possivelmente caracterizando uma citotoxicidade. O kit utilizado é baseado em poliaminas que agem de forma semelhante aos lipídios catiônicos, ou seja, são nanopartículas de carga positiva que formam complexos com os siRNAs tipicamente de cargas negativas, facilitando a penetração destas através da membrana plasmática (Kim *et al.*, 2009). Contudo, altas densidades de cargas catiônicas podem eventualmente induzir uma desestabilidade na membrana plasmática celular o que pode levar a citotoxicidade (Piest *et al.*, 2010). Em um estudo recente, foi demonstrado que, em condições de transfecção realizadas neste estudo, utilizando uma estratégia de transfecção baseado em lipídios catiônicos, em quarenta e oito horas houve uma viabilidade celular em torno de 68% avaliado por XTT em células de rim de macaco verde africano-SV40 (COS-7) em meio com baixa concentração de soro (Piest *et al.*, 2010). Levando tais parâmetros em consideração, mesmo com a toxicidade observada, a viabilidade celular de 75,5% em cinco dias de observação parece ser o esperado (Piest *et al.*, 2010).

Após o estabelecimento da viabilidade celular, o kit de transfecção utilizado foi avaliado em relação a eficiência de internalização das sequências para a linhagem celular FRhK-4. O tempo de transfecção pode variar entre 4h a 48h de acordo com a linhagem celular utilizada (Ambion, 2007). Nossos resultados demonstraram que é possível identificar inúmeros complexos de transfecção no citoplasma celular após quatro horas de transfecção. Para estudos com CBV4, a formação destes complexos foi observada 24 horas pós-transfecção (Tan *et al.*, 2010). Estudos anteriores já demonstraram que períodos muito longos de transfecção podem diminuir a viabilidade celular pela citotoxicidade inerente ao agente de transfecção, ainda assim, a taxa de divisão celular torna transiente a ação dos complexos de

siRNAs sintéticos em células de mamíferos, levando conseqüentemente a uma diluição dos complexos de transfecção com o passar do tempo (Capodici *et al.*, 2002). Além disso, o meio de cultura em que ocorre a transfecção deve conter baixas concentrações de soro fetal bovino (SFB), pois sabe-se que tal suplemento contém grandes quantidades de inibidores que podem eventualmente degradar os complexos de transfecção (Akhtar *et al.*, 2007), em contrapartida, o SFB é essencial ao crescimento celular, sendo assim, tempos relativamente curtos de transfecção em meio com baixas concentrações de soro provavelmente asseguram uma internalização eficiente sem prejudicar o crescimento celular (Akhtar *et al.*, 2007).

A ação de siRNAs para diminuição da replicação do vírus do HAV, demonstrou ser dose-dependente, como já observado em estudos de inibição de HSV e para o vírus da hepatite E (HEV) (Bhuyan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009). Neste trabalho a concentração ideal de siRNA foi 18nM. Em estudos de silenciamento gênico em células de mamíferos, observa-se o uso de uma grande variedade de concentrações de siRNAs, que tipicamente variam de 20nM (Semizarov *et al.* 2003) a 200nM (Wu *et al.* 2003). Entretanto, outros estudos já demonstraram que concentrações acima de 10nM já são suficientes para um silenciamento efetivo (Bhuyan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009). Sendo assim, observou-se ainda perda do silenciamento na concentração de 21nM, o que poderia caracterizar um efeito inespecífico. A concentração ideal é aquela que garanta o maior grau de silenciamento sem efeitos inespecíficos. O estabelecimento de uma curva dose-reposta para as sequências de siRNAs utilizadas é de extrema relevância, pois trabalhos já mostraram que baixas concentrações de siRNAs podem produzir efeitos inespecíficos, assim como, altas concentrações (Persengiev *et al.*, 2004). Tais efeitos incluem principalmente a ação sobre genes inespecíficos.

Com relação à taxa de silenciamento encontrada, a sequência 2C1 isolada foi a que apresentou uma melhor taxa de manutenção do silenciamento nos cinco dias analisados. Tal sequência tem como alvo a região 2C do genoma, responsável pela produção da helicase viral. Nos estudos de Kanda e colaboradores em 2004, que utiliza as mesmas sequências deste estudo, foi identificado uma excepcional eficiência desta sequência de siRNA, com 73,6% de inibição em quarenta e oito horas pós- transfecção. Isto pode ser devido ao fato de que a região alvo para a ação desta sequência ser mais exposta no genoma do HAV (cepa 18f) do que as

demais sequências utilizadas (Kusov *et al.*, 2006). Contudo, com relação às células transfectadas com tal sequência, a visualização da diminuição da replicação pela intensidade de fluorescência se apresentou muito tênue. O HAV possui uma replicação persistentemente e não sincrônica, e uma diminuição dos níveis de RNA viral não necessariamente pode garantir uma diminuição na produção de proteínas estruturais formadoras dos epítopos conformacionais de superfície do HAV (Kusov *et al.*, 2006).

As sequências 3D1 e 3D2 também foram avaliadas por Kanda e colaboradores em 2004, e em tal estudo foi observado 65,7% e 48,6% de silenciamento respectivamente também em quarenta e oito horas pos-transfecção. Confrontando tais resultados com os encontrados no presente trabalho, verificamos índices relativamente maiores de silenciamento para tais sequências no tempo analisado, com uma queda de ação ao terceiro dia. Esta diferença pode estar relacionada com o fato de nossa análise medir diretamente a quantidade de RNA viral, o estudo tomado como referência realiza uma análise baseada na atividade da enzima luciferase que foi flanqueada a uma replicon do HAV, o que talvez possa não observar níveis reais totais de silenciamento.

Foi observado ainda que tais sequências possuem diferentes índices de silenciamento, mesmo considerando que elas agem degradando o mesmo RNAm viral alvo. Isto pode estar relacionado com os diferentes rearranjos estruturais secundários que o RNA mensageiro alvo pode apresentar em toda a sua extensão, o que caracteriza uma ação mais potente de determinada sequência em detrimento de outra (Kawasaki *et al.*, 2003). Na análise de imunofluorescência, também foi observado que o silenciamento, com a sequência 3D2 parece funcionar melhor que a 3D1.

Em estudos de inibição por siRNA em Coxsackievirus B4 (CVB4), outro membro na família *Picornaviridae*, também observou-se uma inibição da replicação viral para sequências direcionadas para a região 3D no genoma, além de outras sequências para regiões não estruturais. Foi encontrando aproximadamente 60% de inibição em 48 horas pós-transfecção na análise por PCR em tempo real, confirmado pela redução da formação de placas em células tratadas com esta sequência. Contudo, não foi demonstrado uma maior atividade antiviral quando sequências para alvos distintos foram utilizadas em conjunto (Tan *et al.*, 2010).

Para Coxsackievirus B3 (CVB3), também pertencente à família dos picornavírus, sequências para regiões estruturais, não estruturais e não codificantes foram analisadas. Os alvos não estruturais apresentaram um melhor índice de inibição com relação aos alvos estruturais (Yuan *et al.*, 2005) o mesmo foi observado para enterovírus 71 (EV71) (Sim *et al.*, 2005).

As regiões do genoma que codificam proteínas não-estruturais, exercem importantes funções no processo de replicação e conseqüentemente possuem uma menor taxa de mutação. Isto é um fator a ser considerado, principalmente no que se refere a síntese das sequências de siRNAs para vírus com genoma RNA, tais como HAV, CVB3, CVB4, que já possuem naturalmente uma maior taxa de mutação com relação aos vírus de DNA, favorecendo o surgimento de variantes que eventualmente possam escapar da ação de siRNAs (Gitlin *et al.*, 2005)

Quando duas sequências foram transfectadas simultaneamente, encontramos uma melhora no índice de silenciamento com a combinação que resulta na degradação do mesmo RNAm alvo (3D1+3D2), confirmado pela imunofluorescência realizada para o HAV. As demais combinações (2C1+3D1 e 2C1+3D2) também obtiveram boas taxas de silenciamento, nos cinco dias analisados, contudo com 2C1+3D2 funcionando melhor que a 2C1+3D1 no curso da infecção. Com relação à comparação na imunofluorescência, não foi possível visualizar diferenças significativas de intensidade entre tais combinações, todavia a intensidade se mostrou menor comparada ao controle positivo.

Os melhores resultados de silenciamento foram observados nas análises feitas com as três sequências juntas onde foi possível observar um silenciamento efetivo tanto na análise molecular quanto na imunofluorescência. Estudos já demonstraram que existe uma maior eficiência com o uso de múltiplas sequências na diminuição da replicação de HCV (Kronke *et al.*, 2004), poliovírus (Gitlin *et al.*, 2005) e HIV (Ji *et al.*, 2003). Além disso, a utilização de múltiplas sequências reduzem efeitos inespecíficos em genes celulares, possivelmente assegurando que somente sequências conservadas no genoma viral sirvam como alvo (Kusov *et al.*, 2006).

Neste estudo, foi possível a detecção do antígeno viral produzidos pelo HAV 48 horas pós-infecção. Estudos anteriores relatam que a detecção de antígenos virais do HAV por imunofluorescência ocorre em torno de 72 horas pós-infecção

(Zou *et al.*, 1991). Resultados preliminares de um projeto desenvolvido em nosso laboratório para produção de um anticorpo primário IgY anti-HAV (Vasconcelos, 2010) usado neste estudo, vem demonstrando que tal anticorpo parece ser mais sensível para a detecção de antígenos virais do HAV em tecidos hepáticos de primatas não humanos se comparado com o anticorpo norte-americano anti-HAV (United States Biological, Swampscott, MA, USA) disponível comercialmente (dados ainda não publicados). Sendo assim, é provável que seja possível uma detecção precoce da partícula viral em culturas celulares infectadas utilizando tal anticorpo.

Com relação aos estudos de silenciamento de outros vírus causadores de hepatites, vemos que para a hepatite B (HBV), o principal alvo para ação de siRNAs tem sido o antígeno de superfície “s” (HBsAg), sendo relatado uma redução de 80% (Ying *et al.*, 2007) a 94,2% (McCaffrey *et al.*, 2003) em cultura celular e de 84,5% (McCaffrey *et al.*, 2003) a 90% (Ying *et al.*, 2007) em soro de camundongos. Além disso, foi ainda observado por detecção histopatológica, uma redução de cerca de 90% do antígeno de superfície “c” (HBcAg) em hepatócitos de camundongos sob a ação de siRNAs, demonstrando que o silenciamento também pode ocorrer *in vivo* (McCaffrey *et al.*, 2003). Já para Hepatite C, estudos relatam uma redução de cerca de 99% para sequências desenhadas para as regiões ORF1 e ORF2 do genoma viral (Kronke *et al.*, 2004), além de uma redução de 92% para regiões não codificantes do genoma (Chevalier *et al.*, 2007). Para o vírus da Hepatite E, também foi observado o silenciamento por siRNAs, cerca de 80% de inibição para a região ORF 2 do genoma (Huang *et al.*, 2009).

Nossos estudos demonstraram ainda um caráter transiente da ação dos siRNAs com o passar do tempo para a maioria das sequências e suas combinações. Já foi observado que neste sistema os siRNAs possuem um decaimento considerável depois de cinco dias de ação (Bhuyan *et al.*, 2004). Em trabalhos com EV71, foi observada uma ação de no máximo 72h (Sim *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007). Vários estudos vem buscando uma melhor eficiência e sustentabilidade na interferência da replicação viral, incluindo o desenvolvimento de vetores que expressam siRNAs, além de múltiplas aplicações de siRNAs (Kusov *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010).

Além disso, estudos sobre a cinética de replicação HAV em cultura celular de FRHK-4, demonstraram que a replicação ocorre a partir da primeira hora pós-

infecção (hpi), com um pico de replicação entre 30hpi e 50hpi e formação de grandes quantidades de partículas virais ao terceiro dia de infecção (de Paula *et al.*, 2009), o que poderia justificar nossas melhores taxas de inibição ao segundo e terceiro dia pós-infecção.

Em outros trabalhos, foi observado ainda que algumas sequências podem aumentar a replicação viral, podendo possivelmente ser resultante de uma estratégia de escape viral a ação de siRNAs (Kusov *et al.*, 2006). Em nosso sistema, a replicação HAV não foi completamente suprimida, possivelmente devido à estabilidade do RNA e remanescente de transcrição, permitindo tradução sustentada e replicação do genoma viral (Gauss-Muller *et al.*, 2002).

Consideramos estes resultados preliminares de silenciamento *in vitro* satisfatórios, pois parecem estar de acordo com outros dados presentes na literatura. Todavia, pretendemos realizar ainda alguns aperfeiçoamentos metodológicos, visando aumentar a eficácia da ação das sequências trabalhadas, como por exemplo, a busca de outras metodologias de transfecção com menores taxas de citotoxicidade e padronizações de outros controles endógenos.

A utilização de siRNAs como uma estratégia anti-viral, vem progredindo rapidamente. Esta ação alvo-específica que atua diminuindo a replicação viral pela degradação do genoma viral, tem se mostrado uma técnica altamente promissora, surgindo como uma alternativa com relação ao desenvolvimento de novas terapias anti-virais. Os vírus de genoma RNA, como o HAV, são modelos relativamente mais atrativos para a ação de siRNAs, pois tais podem agir em vários níveis do ciclo replicativo, inclusive no próprio genoma. No entanto, a metodologia de RNAi é confrontada com vários desafios que devem ser superados para uma efetiva utilização como estratégia antiviral.

Além disso, uma das principais perspectivas deste projeto é iniciar os estudos utilizando as três sequências em conjunto, na tentativa de silenciamento da replicação do HAV *in vivo*. Os modelos experimentais utilizados seriam primatas não humanos infectados, onde já temos dados do curso da infecção pelo HAV (Amado *et al.*, 2010). Este seria um passo importante na tentativa do desenvolvimento de uma terapia contra a Hepatite A.



## 7. Conclusões

- ❖ Foi possível traçar um perfil de silenciamento da replicação do HAV por RNAs de interferência em cultura celular.
- ❖ Observou-se uma queda de 24,5% na viabilidade celular após 5 dias de infecção, indicando uma possível citotoxicidade referente ao kit de transfecção utilizado.
- ❖ A concentração ideal de siRNAs para inibição da replicação do HAV foi de 18nM.
- ❖ Observou-se que as sequências foram internalizadas com o kit de transfecção utilizado em 24 horas após a transfecção.
- ❖ A sequência 2C1 que inibe a helicase viral inibiu a replicação do HAV abaixo de 50% nos 5 dias analisados.
- ❖ As melhores taxas de inibição foram conseguidas com a ação das três sequências em conjunto, inibindo a helicase e a protease viral simultaneamente, com 85,4% de inibição no 2º dia pós-transfecção.
- ❖ Ao 3º dias pós-transfecção, foi observada uma queda na taxa de silenciamento.
- ❖ Através da imunofluorescência, a inibição da replicação do HAV foi confirmada para as sequências analisadas.

## 8. Referências Bibliográficas

- ✓ Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2003**; 67(4):657-85.
- ✓ Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J. Biotechnol.*, **2006**; 124(1):12-25.
- ✓ Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J. Clin. Invest.*, **2007**; 117(12):3623-32.
- ✓ Amado LA, Marchevsky RS, de Paula VS, Hooper C, Freire Mda S, Gaspar AM, et al. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. *Int. J. Exp. Pathol.*, **2010**; 91(1):87-97.
- ✓ Amado LA, Villar LM, de Paula VS, de Almeida AJ, Gaspar AM. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, **2006**; 101(2): 149-55.
- ✓ Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Gaspar AM. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J. Virol. Methods*, **2008**; 148(1-2):74-80.
- ✓ Ambion. siRNA Screening Guide. Disponível em: [www.ambion.com/RNAi](http://www.ambion.com/RNAi). **2007**.
- ✓ Amon JJ, Devasia R, Xia G, Nainan OV, Hall S, Lawson B, et al. Molecular epidemiology of foodborne hepatitis a outbreaks in the United States, 2003. *J. Infect. Dis.*, **2005**; 192(8): 1323-1330.
- ✓ Angarano G, Trotta F, Monno L, Santantonio T, Pastore G. Serum IgA anti-hepatitis A virus as detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Diagnostic significance in patients with acute and protracted hepatitis A. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **1985**; 3(6): 521-523.
- ✓ Asher LV, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.*, **1995**; 47(3): 260-268.
- ✓ Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr. Drug Targets*, **2010**; 11(3):345-60.
- ✓ Ashraf SI, McLoon AL, Sclarsic SM, Kunes S. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, **2006**; 13;124(1):191-205.
- ✓ Baker BF, Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1999**; 10;1489(1):3-18.

- ✓ Baptista ML, Silva M, Lima MA, Yoshida CF, Gaspar AM, Galler R. Genetic variability of hepatitis A virus strain HAF-203 isolated in Brazil and expression of the VP1 gene in *Escherichia coli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, **2006**; 101(7):759-66.
- ✓ Baroudy BM, Ticehurst JR, Miele TA, Maizel JV, Purcell RH, Feinstone SM. Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1985**; 82(7): 2143-2147.
- ✓ Barquinero J, Eixarch H, Perez-Melgosa M. Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther.*, **2004**; 11 Suppl 1:S3-9.
- ✓ Bell BP, Shapiro CN, Alter MJ, Moyer LA, Judson FN, Mottram K, *et al.* The diverse patterns of hepatitis A epidemiology in the United States-implications for vaccination strategies. *J. Infect. Dis.*, **1998**; 178(6): 1579-1584.
- ✓ Bell BP. Global epidemiology of hepatitis A: implications for control strategies. *In: Margolis, H.S.; Alter, M.J.; Liang, J.T.; Dienstag, J.L. (ed.). Viral hepatitis and liver disease.* London (United Kingdom): International Medical Press; **2002**. p. 9–14
- ✓ Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, **2005**; 22(5):607-19.
- ✓ Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **2001**; 409(6818):363-6.
- ✓ Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**; 296(4):1000-4.
- ✓ Bhuyan PK, Kariko K, Capodici J, Lubinski J, Hook LM, Friedman HM, *et al.* Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *J. Virol.*, **2004**; 78(19):10276-81.
- ✓ Bialek SR, Thoroughman DA, Hu D, Simard EP, Chattin J, Cheek J, *et al.* Hepatitis A incidence and hepatitis a vaccination among American Indians and Alaska Natives, 1990-2001. *Am. J. Public Health*, **2004**; 94(6): 996-1001.
- ✓ Bishop NE. Hepatitis A virus replication: an intermediate in the uncoating process. *Intervirology.*, **2000**; 43(1):36-47.
- ✓ Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.*, **2001**; 1:34.
- ✓ Bloch AB, Stramer SL, Smith JD, Margolis HS, Fields HA, McKinley TW, *et al.* Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. *Am. J. Public Health*, **1990**; 80(4): 428-430.

- ✓ Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, **2004**; 10(2):185-91.
- ✓ Bosch A, Sánchez G, Le Guyader F, Vanaclocha H, Haugarreau L, Pinto RM. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.*, **2001**; 43(12): 61-65.
- ✓ Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.*, **2000**; 182(1): 12-17.
- ✓ Bradley SP, Rastellini C, da Costa MA, Kowalik TF, Bloomenthal AB, Brown M, *et al.* Gene silencing in the endocrine pancreas mediated by short-interfering RNA. *Pancreas*, **2005**; 31(4):373-9.
- ✓ Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*, **2003**;113(1):25-36.
- ✓ Brown EA, Day SP, Jansen RW, Lemon SM. The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J. Virol.*, **1991**; 65(11):5828-38.
- ✓ Bruisten SM, van Steenberghe JE, Pijl AS, Niesters HG, van Doornum, GJ, Coutinho RA. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J. Med. Virol.*, **2001**; 63(2): 88-95.
- ✓ Brundage SC, Fitzpatrick AN. Hepatitis A. *Am. Fam. Physician*, **2006** Jun; 73(12):2162-8.
- ✓ Buti M, Jardí R, Bosch A, Rodríguez F, Sánchez G, Pinto R, *et al.* Assessment of the PCR-Southern blot technique for the analysis of viremia in patients with acute hepatitis A. *Gastroenterol. Hepatol.*, **2001**; 24(1): 1-4.
- ✓ Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, **2004**; 10(12):1957-66.
- ✓ Cameron JDS. Infective hepatitis. *Q. J. Med.*, **1943**; 12: 139–155.
- ✓ Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J. Immunol.*, **2002**; 169(9):5196-201.
- ✓ Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, *et al.* MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell*, **2007**; 12(4):503-14.
- ✓ Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.*, **2002**; 16(21):2733-42.
- ✓ Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **2009**; 136(4):642-55.

- ✓ Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, **1981**; 27(3 Pt 2):487-96.
- ✓ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Final 2003 reports of notifiable diseases. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **2004**; 53: 687–705.
- ✓ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **1999**; 48(RR-12):1–37.
- ✓ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **2006**; 55(RR07):1–23.
- ✓ Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **2005**; 436(7051):740-4.
- ✓ Chevalier C, Saulnier A, Benureau Y, Flechet D, Delgrange D, Colbere-Garapin F, *et al.* Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. *Mol Ther.*, **2007**; 15(8):1452-62.
- ✓ Chiriaco P, Guadalupi C, Armigliato M, Bortolotti F, Realdi G. Polyphasic course of hepatitis type A in children. *J. Infect. Dis.*, **1986**; 153(2): 378-379.
- ✓ Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J. Cell Physiol.*, **2007**; 213(2):412-9.
- ✓ Chung WJ, Okamura K, Martin R, Lai EC. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr Biol.*, **2008**; 3;18(11):795-802.
- ✓ Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J. Virol.*, **2002**; 76(18):9225-31.
- ✓ Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q. J. Med.*, **1912**; 6:1–29.
- ✓ Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo. J.*, **1996**; 17;15(12):3153-63.
- ✓ Cogoni C, Macino G. Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science*, **1999**; 286(5448):2342-4.
- ✓ Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J. Infect. Dis.*, **1989**; 160(5): 887-890.

- ✓ Cohen JI, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM, Purcell RH. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987a**; 84(8): 2497-2501.
- ✓ Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J. Virol.*, **1987b**; 61(1): 50-59.
- ✓ Cohen L, Benichou D, Martin A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J. Virol.*, **2002**; 76(15):7495-505.
- ✓ Colbère-Garapin F, Blondel B, Saulnier A, Pelletier I, Labadie K. Silencing viruses by RNA interference. *Microbes Infect.*, **2005**; 7(4):767-75.
- ✓ Cook PD. Medicinal chemistry strategies for antisense research. *Antisense Research and Applications*, **1993**; 149–188.
- ✓ Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, Billaudel S, Ferré V. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hepat.*, **2002a**; 9(2): 101-106
- ✓ Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, *et al.* Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.*, **2002b**; 76(18): 9516-9525.
- ✓ Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2001**; 14(1): 38-58.
- ✓ Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingehayde C, Dus M, *et al.* An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature.*, **2008**; 453(7196):798-802.
- ✓ Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect. Immun.*, **1981**; 32(1): 388-393.
- ✓ Dagan R, Leventhal A, Anis E, Slater P, Ashur Y, *et al.* Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA.*, **2005**; 294(2): 202-210.
- ✓ Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, *et al.* Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat. Biotechnol.*, **2005**; 23(7):890-5.
- ✓ de Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AM. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Virol.*, **2002**; 66(1):22-7.
- ✓ de Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, Jesus MS, da Silva NM, Gaspar AM. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res.*, **2007**; 41(6):1169-1176.

- ✓ de Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AM, Robertson BH. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J. Med. Virol.*, **2004**; 73(3):378-83.
- ✓ de Paula VS, Niel C, Teves SC, Villar LM, Virgolino H, Gaspar AM. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Brazilian Amazon. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2006**; 21(9):1435-8.
- ✓ de Paula VS, Perse AS, Amado LA, de Moraes LM, de Lima SM, Tourinho RS, *et al.* Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2009**; 28(10):1167-76.
- ✓ De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M. *et al.* Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J. Infect. Dis.*, **1999**; 179(1): 37-43.
- ✓ Delem AD. Comparison of modified HAVAB and ELISA for determination of vaccine-induced anti-HAV response. *Biologicals*, **1992**; 20(4): 289-291.
- ✓ Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **2004**; 432(7014):231-5.
- ✓ Dentinger CM. Emerging infections: hepatitis A. *Am. J. Nurs.*, **2009**; 109(8): 29-33.
- ✓ Devalle S, de Paula VS, de Oliveira JM, Niel C, Gaspar AM. Hepatitis A virus infection in hepatitis C Brazilian patients. *J. Infect.*, **2003**; 47(2):125-8.
- ✓ Dienstag JL, Gust ID, Lucas CR, Wong DC, Purcell RH. Mussel-associated viral hepatitis, type A: serological confirmation. *Lancet*, **1976**; 1(7959): 561-563.
- ✓ Dignani MC, Miceli MH, Rosa CM, Gatica J, Martinez-Rolon J, Pizzolato M. Loss of hepatitis A virus (HAV) antibodies after peripheral stem cell transplantation (PSCT). *Bone Marrow Transplant*, **2003**; 31(9): 809-812.
- ✓ Dolja VV, Carrington JC. Evolution of positive-strand RNA viruses. *Semin Virol.*, **1992**; 3: 315-326.
- ✓ dos Santos DC, da Silva Gomes Martinho JM, Pacheco-Moreira LF, Carvalho Viana de Araujo C, Caroli-Bottino A, *et al.* Eosinophils involved in fulminant hepatic failure are associated with high interleukin-6 expression and absence of interleukin-5 in liver and peripheral blood. *Liver. Int.*, **2009**; 29(4): 544-551.
- ✓ Duchaine TF, Slack FJ. rna interference and micro rna -oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges. *Curr. Oncol.*, **2009**; 16(4):61-6.
- ✓ Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.*, **2001b**; 411(6836):494-8.

- ✓ Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, **2001a**; 15(2):188-200.
- ✓ Emerson SU, Tsarev SA, Govindarajan S, Shapiro M, Purcell RH. A simian strain of hepatitis A virus, AGM-27, functions as an attenuated vaccine for chimpanzees. *J. Infect. Dis.*, **1996**; 173(3): 592-597.
- ✓ European Centre for Disease Prevention and Control: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008 (ECDPC). Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control. [http://ecdc.europa.eu/en/files/pdf/Publications/081215\\_AER\\_long\\_2008.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/files/pdf/Publications/081215_AER_long_2008.pdf)
- ✓ Fagegaltier D, Bouge AL, Berry B, Poisot E, Sismeiro O, Coppee JY, et al. The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106(50):21258-63.
- ✓ Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.*, **1998**; 72(8):6621-8.
- ✓ Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science*, **1973**; 182: 1026–1028.
- ✓ Feinstone SM, Daemer RJ, Gust ID, Purcell RH. Live attenuated vaccine for hepatitis A. *Dev. Biol. Stand.*, **1983**; 54: 429-432.
- ✓ Findlay GM, Dunlop JL, Brown HC. Observations on epidemic catarrhal jaundice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1931**; 25: 7–24.
- ✓ Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **1998**; 391(6669):806-11.
- ✓ Fischer GE, Thompson N, Chaves SS, Bower W, Goldstein S, Armstrong G, et al. The epidemiology of hepatitis A virus infections in four Pacific Island nations, 1995-2008. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **2009**;103(9):906-10.
- ✓ FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine.*,2010; 28(3):583-8.
- ✓ Flehmig B. Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, **1981**; 170(2):73-81.
- ✓ Flehmig B. Hepatitis A-virus in cell culture: I. propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med. Microbiol. Immunol.*, **1980**; 168(4): 239-248.
- ✓ Forstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.*, **2005**; 3(7):e236.



- ✓ Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H, Miki M, Omata M. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology*, **1997**; 26(6): 1634-1639.
- ✓ Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Okita K, et al. Genetic analysis of hepatitis A virus protein 2C in sera from patients with fulminant and self-limited hepatitis A. *Hepatogastroenterology*, **2007**; 54(75):871-7.
- ✓ Gaspar AM, Vitral CL, Yoshida CF, Schatzmayr HG. Fast growth of a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203) in a primate cell line. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1993**; 26(2):203-6.
- ✓ Gauss-Muller V, Jurgensen D, Deutzmann R. Autoproteolytic cleavage of recombinant 3C proteinase of hepatitis A virus. *Virology*, **1991**; 182(2):861-4.
- ✓ Gauss-Muller V, Kusov YY. Replication of a hepatitis A virus replicon detected by genetic recombination in vivo. *J. Gen. Virol.*, **2002**; 83(Pt 9):2183-92.
- ✓ Gauss-Muller V, Lottspeich F, Deinhardt F. Characterization of hepatitis A virus structural proteins. *Virology*, **1986**; 155(2): 732-736.
- ✓ Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100(5):2718-23.
- ✓ Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, et al. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, **2008**; 23;320(5879):1077-81.
- ✓ Giles JP, Lieberhaber H. Krugman, Lattimer C. Early Viremia and Viruria in Infectious Hepatitis. *Virology*, **1964**; 24: 107-108.
- ✓ Gitlin L, Stone JK, Andino R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J. Virol.*, **2005**; 79(2):1027-35.
- ✓ Glazov E, Phillips K, Budziszewski GJ, Schöb H, Meins F Jr, Levin JZ. A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in Arabidopsis. *Plant J.*, **2003**; 35(3): 342-349.
- ✓ Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore)*, **1992**; 71(1): 14-23.
- ✓ Goswami BB, Burkhardt III W, Cebula TA. Identification of genetic variants of hepatitis A virus. *J. Virol. Methods*, **1997**; 65(1): 95-103.
- ✓ Grimaud C, Bantignies F, Pal-Bhadra M, Ghana P, Bhadra U, Cavalli G. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell*, **2006**; 10;124(5):957-71.

- ✓ Grinde B, Stene-Johansen K, Sharma B, Hoel T, Jensenius M, Skaug K. Characterisation of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers--infection by needle sharing? *J. Med. Virol.*, **1997**; 53(1): 69-75.
- ✓ Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, **2001**; 106(1):23-34.
- ✓ Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **1983**; 35(3 Pt 2):849-57.
- ✓ Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, **1995**; 19;81(4):611-20.
- ✓ Gust ID. Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world. *Vaccine*, **1992**; 10 Suppl 1: S56-S58.
- ✓ Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.*, **2007**; 25(12):1435-43.
- ✓ Hadler SC, Webster HM, Erben JJ, Swanson JE, Maynard JE. Hepatitis A in day-care centers. A community-wide assessment. *N. Engl. J. Med.*, **1980**; 302(22): 1222-1227.
- ✓ Hajeri PB, Singh SK. siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part I. Designing of siRNAs. *Drug. Discov. Today*, **2009**; 14(17-18):851-8.
- ✓ Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, Pan QC, Fu TY, et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis*, **1991**; 164(5): 852-859.
- ✓ Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **2000**; 404(6775):293-6.
- ✓ Harkess J, Gildon B, Istre GR. Outbreaks of hepatitis A among illicit drug users, Oklahoma, 1984-87. *Am. J. Public Health*, **1989**; 79(4): 463-466.
- ✓ He ML, Zheng B, Peng Y, Peiris JS, Poon LL, Yuen KY, et al. Inhibition of SARS-associated coronavirus infection and replication by RNA interference. *JAMA*, **2003**; 290(20):2665-6.
- ✓ He S, Zhang D, Cheng F, Gong F, Guo Y. Applications of RNA interference in cancer therapeutics as a powerful tool for suppressing gene expression. *Mol. Biol. Rep.*, **2009**; 36(8):2153-63.
- ✓ Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, Hadwiger P, John M, Heil G, et al. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood*, **2003**; 101(8):3157-63.

- ✓ Heister T, Heid I, Ackermann M, Fraefel C. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J. Virol.*, **2002**; 76(14):7163-73.
- ✓ Henning KJ, Bell E, Braun J, Barker ND. A community-wide outbreak of hepatitis A: risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Am. J. Med.*, **1995**; 99(2): 132-136.
- ✓ Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A Virus. *In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. (ed.). Fields Virology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2007. p. 911-940.*
- ✓ Hollinger FB, Ticehurst J. Hepatitis A virus. *In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. (ed.). Fields Virology. 3rd ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 735–782.*
- ✓ Holmes AW, Wolfe L, Rosenblate H, Deinhardt F. Hepatitis in marmosets: induction of disease with coded specimens from a human volunteer study. *Science*, **1969**; 165(895): 816-817.
- ✓ Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Xu ZL, Sakurai F, Ishii-Watabe A, *et al.* Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, **2004**; 15(8):813-9.
- ✓ Huang F, Zhou J, Yang Z, Cui L, Zhang W, Yuan C, *et al.* RNA interference inhibits hepatitis E virus mRNA accumulation and protein synthesis in vitro. *Vet. Microbiol.*, **2009**; 142(3-4):261-7.
- ✓ Huang SN, Lorenz D, Gerety RJ. Electron and immunoelectron microscopic study on liver tissues of marmosets infected with hepatitis A virus. *Lab. Invest.*, **1979**; 41(1): 63-71.
- ✓ Hurni WM, Laufer D, Miller WJ, Ryan J, Watson B. Anti-hepatitis A in the general population and in hepatitis A vaccinees using saliva and serum as diagnostic media. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1993**; 694: 289-292.
- ✓ Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **2001**; 293(5531):834
- ✓ Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **2002**; 297(5589):2056-60.
- ✓ Innis BL, Snitbhan R, Kunasol P, Laorakpongse T, Poopatanakool W, Kozik CA, *et al.* Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA*, **1994**; 271(17): 1328-1334.
- ✓ Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, *et al.* A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J. Virol.*, **2007**; 81(6):2980-94.

- ✓ Jacobsen KH, Koopman JS. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol. Infect.*, **2004**; 132(6): 1005-1022.
- ✓ Jacobson SK, Buttery R, Parry JV, Perry KR, Wreghitt TG. Investigation of a hepatitis A outbreak in a primary school by sequential saliva sampling. *Clin. Diagn. Virol.*, **1995**; 3(2): 173-180.
- ✓ Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, **2002**; 418(6896):435-8.
- ✓ Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**; 87(8): 2867-2871.
- ✓ Jarvis TC, Wincott FE, Alby LJ, McSwiggen JA, Beigelman L, Gustofson J, et al. Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myc. *J. Biol. Chem.*, **1996**; 15;271(46):29107-12.
- ✓ Jecht M, Probst C, Gauss-Muller V. Membrane permeability induced by hepatitis A virus proteins 2B and 2BC and proteolytic processing of HAV 2BC. *Virology*, **1998**; 252(1):218-27.
- ✓ Jere D, Arote R, Jiang HL, Kim YK, Cho MH, Cho CS. Bioreducible polymers for efficient gene and siRNA delivery. *Biomed Mater.*, **2009**; 4(2):025020.
- ✓ Ji J, Wernli M, Klimkait T, Erb P. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett.*, **2003**; 552(2-3):247-52.
- ✓ Jia XY, Tesar M, Summers DF, Ehrenfeld E. Replication of hepatitis A viruses with chimeric 5' nontranslated regions. *J. Virol.*, **1996**; 70(5):2861-8.
- ✓ Jiang X, Estes MK, Metcalf TG. Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**; 53(10): 2487-2495.
- ✓ Jindal M, Rana SS, Gupta RK, Das K, Kar P. Serological study of hepatitis A virus infection amongst the students of a medical college in Delhi & evaluation of the need of vaccination. *Indian J. Med. Res.*, **2002**; 115: 1-4.
- ✓ Jones L, Ratcliff F, Baulcombe DC. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.*, **2001**; 11(10):747-57.
- ✓ Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, Chadha MS. Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis a. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2002**; 9(4):840-5.
- ✓ Joshi MS, Walimbe AM, Chitambar SD. Evaluation of genomic regions of hepatitis A virus for phylogenetic analysis: Suitability of the 2C region for genotyping. *J. Virol. Methods*, **2008**; 153(1):36-42.
- ✓ Jothikumar N, Paulmurugan R, Padmanabhan P, Sundari RB, Kamatchiammal S, Rao KS. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and

- hepatitis E virus isolated from drinking water samples. *J. Environ. Monit.*, **2000**; 2(6): 587-590.
- ✓ Kaiser PK, Symons RC, Shah SM, Quinlan EJ, Tabandeh H, Do DV, *et al.* RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027. *Am. J. Ophthalmol.*, **2010**; 150(1):33-9 e2.
  - ✓ Kanda T, Kusov Y, Yokosuka O, Gauss-Muller V. Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**; 318(2):341-5.
  - ✓ Kang JH, Lee KY, Kim CH, Sim D. Changing hepatitis A epidemiology and the need for vaccination in Korea. *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.*, **2004**; 22(4): 237-242.
  - ✓ Kao HW, Ashcavai M, Redeker AG. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology*, **1984**; 4(5): 933-936.
  - ✓ Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo. J.*, **1996**; 15(16):4282-96.
  - ✓ Karenyi IV, Andzhaparidze AG, Orlova TM, Balaian MS. Study of human and simian hepatitis A virus isolated by an immunoenzyme method using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vopr. Virusol.*, **1989**; 34(1): 50-53.
  - ✓ Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, *et al.* *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature*, **2008**; 5:453(7196):793-7.
  - ✓ Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **2003**; 31(3):981-7.
  - ✓ Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.*, **2001**; 15(20):2654-9.
  - ✓ Khaliq S, Khaliq SA, Zahur M, Ijaz B, Jahan S, Ansar M, *et al.* RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. *Biotechnol. Adv.*, **2010**; 28(1):27-34.
  - ✓ Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.*, **2005**; 23(2):222-6.
  - ✓ Kim SS, Ye C, Kumar P, Chiu I, Subramanya S, Wu H, *et al.* Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment. *Mol. Ther.*, **2010**; 18(5):993-1001.
  - ✓ Kim WJ, Kim SW. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm. Res.*, **2009**; 26(3):657-66.
  - ✓ Kiyohara T, Ouchi Y, Hasegawa Y, Sato T, Yoneyama T, Ishii K, *et al.* An in-house-anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture

- enzyme-linked immunosorbent assay: evaluation and application to an HAV outbreak. *J. Med. Virol.*, **2009**; 81(9):1513-6.
- ✓ Klattenhoff C, Theurkauf W. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, **2008**;135(1):3-9.
  - ✓ Kloc A, Martienssen R. RNAi, heterochromatin and the cell cycle. *Trends Genet.*, **2008**; 24(10):511-7.
  - ✓ Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science.*, **2001**; 293(5538):2269-71.
  - ✓ Konduru K, Kaplan GG. Determinants in 3Dpol modulate the rate of growth of hepatitis A virus. *J. Virol.*, **2010**; 84(16):8342-7.
  - ✓ Konduru K, Nakamura SM, Kaplan GG. Hepatitis A virus (HAV) packaging size limit. *Virol. J.*, **2009**; 6:204.
  - ✓ Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, *et al.* Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J. Virol.*, **2004**; 78(7):3436-46.
  - ✓ Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, **1982**; 31(1):147-57.
  - ✓ Krugman S, Ward R, Giles JP, Bodansky O, Jacobs AM. Infectious hepatitis: detection of virus during the incubation period and in clinically inapparent infection. *N. Engl. J. Med.*, **1959**; 261: 729-734.
  - ✓ Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*, **1967**; 200(5): 365-373.
  - ✓ Krugman S, Ward R, Giles JP. The natural history of infectious hepatitis. *Am. J. Med.*, **1962**; 32: 717-728.
  - ✓ Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A, Sgro JY, Gauss-Muller V. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *J. Virol.*, **2006**; 80(11):5599-610.
  - ✓ Kusov YY, Gosert R, Gauss-Muller V. Replication and in vivo repair of the hepatitis A virus genome lacking the poly(A) tail. *J. Gen. Virol.*, **2005**; 86(Pt 5):1363-8.
  - ✓ LaBrecque FD, LaBrecque DR, Klinzman D, Perlman S, Cederna JB, Winokur PL, *et al.* Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. *J. Clin. Microbiol.*, **1998**; 36(7): 2014-2018.
  - ✓ Laufer DS, Hurni W, Watson B, Miller W, Ryan J, Nalin D, *et al.* Saliva and serum as diagnostic media for antibody to hepatitis A virus in adults and in individuals who have received an inactivated hepatitis A vaccine. *Clin. Infect. Dis.*, **1995**; 20(4): 868-871.

- ✓ Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am. J. Epidemiol.*, **1985**; 122(2): 226-233.
- ✓ Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, *et al.* Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **2002**; 20(5):500-5.
- ✓ Lee NS, Rossi JJ. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res.*, **2004**; 102(1):53-8.
- ✓ Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **1993**; 75(5):843-54.
- ✓ Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo. J.*, **2002**; 21(17):4663-70.
- ✓ Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo. J.*, **2004**; 23(20):4051-60.
- ✓ Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, **2004**; 117(1):69-81.
- ✓ Lemon SM, Binn LN, Marchwicki RH. Radioimmunoassay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **1983**; 17(5): 834-839.
- ✓ Lemon SM, Whetter L, Chang KH, Brown EA. Why do human hepatitis viruses replicate so poorly in cell cultures? *FEMS Microbiol. Lett.*, **1992**; 79(1-3): 455-459.
- ✓ Lemon SM. The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products. *Vox Sang.*, **1994**; 67 Suppl 4: 19-26.
- ✓ Lemon SM. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin. Chem.*, **1997**; 43(8 Pt 2):1494-9.
- ✓ Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Hepatitis A: a preventable threat. *Adv. Ther.*, **2005**; 22(6):578-86.
- ✓ Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.*, **2006**; 7(3):314-20.
- ✓ Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, *et al.* Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.*, **2005**; 11(9):944-51.
- ✓ Li J, Guo H, Shi Z, Tu C. In vitro inhibition of CSFV replication by retroviral vector-mediated RNA interference. *J. Virol. Methods*, **2010**.

- ✓ Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, et al. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**; 101(5):1350-5.
- ✓ Li Y, He C, Jin P. Emergence of chemical biology approaches to the RNAi/miRNA pathway. *Chem. Biol.*, **2010**; 25;17(6):584-9.
- ✓ Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, **2004**; 16;431(7006):364-70.
- ✓ Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **2004**; 305(5689):1437-41.
- ✓ Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science*, **2003**; 301(5641):1921-5.
- ✓ Liu Q, Singh SP, Green AG. High-stearic and High-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol.*, **2002**; 129(4):1732-43.
- ✓ Locarnini SA, Coulepis AG, Ferris AA, Lehmann NI, Gust ID. Purification of hepatitis A virus from human feces. *Intervirology*, **1978**; 10(5): 300-308.
- ✓ Locarnini SA, Coulepis AG, Kaldor J, Gust ID. Coproantibodies in hepatitis A: detection by enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.*, **1980**; 11(6): 710-716.
- ✓ Lu L, Ching KZ, de Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, et al. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J. Gen. Virol.*, **2004**; 85(Pt 10): 2943-2952.
- ✓ Lu L, Ho Y, Kwang J. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**; 340(4):1178-83.
- ✓ Lucchetta EM, Carthew RW, Ismagilov RF. The endo-siRNA pathway is essential for robust development of the Drosophila embryo. *PLoS One.*, **2009**; 4(10):e7576.
- ✓ Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **2004**; 303(5654):95-8.
- ✓ Mackiewicz V, Dussaix E, Le Petitcorps MF, Roque-Afonso AM. Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J Clin Microbiol.*, **2004**; 42(9):4329-31.
- ✓ MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**; 105(2):512-7.
- ✓ Mansoor S, Amin I, Hussain M, Zafar Y, Briddon RW. Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends Plant Sci.*, **2006**; 11(11):559-65.



- ✓ Margolis HS, Nainan OV, Krawczynski K, Bradley DW, Ebert JW, Spelbring J, *et al.* Appearance of immune complexes during experimental hepatitis A infection in chimpanzees. *J. Med. Virol.*, **1988**; 26(3): 315-326.
- ✓ Margolis HS. Viral hepatitis. In Wallace, R.B.; Doebbeling, B.N. (ed.). *Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine*. 14th ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; **2000**. p. 174–188.
- ✓ Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*, **2006**; 43(2 Suppl 1): S164-S172.
- ✓ Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.*, **2004**; 18(9):975-80.
- ✓ Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, **2005**; 123(4):607-20.
- ✓ McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, **2003**; 21(6):639-44.
- ✓ McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW, Maynard JE. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J. Clin. Microbiol.*, **1982**; 16(5): 957-958.
- ✓ Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **2004**; 431(7006):343-9.
- ✓ Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **2004**; 16;431(7006):338-42.
- ✓ Merkel OM, Librizzi D, Pfestroff A, Schurrat T, Buyens K, Sanders NN, *et al.* Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *J. Control Release*, **2009**; 138(2):148-59.
- ✓ Moore JC, Atze K, Yeung P, Toro-Ramos AJ, Camarillo C, Thompson K, *et al.* Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res. Ther.*, **2010**; 1(4):23.
- ✓ Moschos SA, Jones SW, Perry MM, Williams AE, Erjefalt JS, Turner JJ, *et al.* Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug. Chem.*, **2007**; 18(5):1450-9.
- ✓ Murray P, Clegg RA, Rees HH, Fisher MJ. siRNA-mediated knockdown of a splice variant of the PK-A catalytic subunit gene causes adult-onset paralysis in *C. elegans*. *Gene*, **2008**; 408(1-2):157-63.

- ✓ Myers JW, Jones JT, Meyer T, Ferrell JE, Jr. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat. Biotechnol.*, **2003**; 21(3):324-8.
- ✓ Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2006**; 19(1): 63-79.
- ✓ Nainan OV, Armstrong GL, Han XH, Williams I, Bell BP, Margolis HS. Hepatitis a molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *J. Infect. Dis.*, **2005**; 191(6): 957-963.
- ✓ Nainan OV, Brinton MA, Margolis HS. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology*, **1992**; 191(2): 984-987.
- ✓ Nainan OV, Margolis HS, Robertson BH, Balayan M, Brinton MA. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.*, **1991**; 72(Pt 7): 1685-1689.
- ✓ Najarian R, Caput D, Gee W, Potter SJ, Renard A, Merryweather J, *et al.* Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**; 82(9): 2627-2631.
- ✓ Nalin DR, Kuter BJ, Brown L, Patterson C, Calandra GB, Werzberger A, *et al.* Worldwide experience with the CR326F-derived inactivated hepatitis A virus vaccine in pediatric and adult populations: an overview. *J. Hepatol.*, **1993**; 18 Suppl 2: S51-S55.
- ✓ Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **1990**; 2(4):279-89.
- ✓ Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, *et al.* siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.*, **2002**; 8(7):681-6.
- ✓ Oba IT, Spina AM, Saraceni CP, Lemos MF, Senhoras R, Moreira RC, *et al.* Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **2000**; 42(4): 197-200.
- ✓ Ochnio JJ, Scheifele DW, Ho M, Mitchell LA. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, **1997**; 35(1): 98-101.
- ✓ Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, Sano H. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol. Biol.*, **2004**; 54(6):931-41.
- ✓ Okamura K, Balla S, Martin R, Liu N, Lai EC. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2008a**; 15(6):581-90.

- ✓ Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, **2008b**; 5;453(7196):803-6.
- ✓ Orban TI, Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *Rna.*, **2005**;11(4):459-69.
- ✓ Pache L, Konig R, Chanda SK. Identifying HIV-1 host cell factors by genome-scale RNAi screening. *Methods*, **2010**; [Epub ahead of print].
- ✓ Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell*, **2002**; 9(2):315-27.
- ✓ Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, et al. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, **2004**; 30;303(5658):669-72.
- ✓ Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O. In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.*, **2004**; 18(18):2237-42.
- ✓ Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.*, **2002**; 12(17):1484-95.
- ✓ Peng Y, Lu JX, Shen XF. shRNA driven by Pol II/T7 dual-promoter system effectively induce cell-specific RNA interference in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**; 360(2):496-500.
- ✓ Perry KR, Parry JV, Vandervelde EM, Mortimer PP. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. *J. Med. Virol.*, **1992**; 38(4): 265-270.
- ✓ Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *Rna*, **2004**; 10(1):12-8.
- ✓ Peters K, Wiktorowicz T, Heinkelein M, Rethwilm A. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J. Virol.*, **2005**; 79(11):7005-13.
- ✓ Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell.*, **2007**; 26(5):611-23.
- ✓ Petrovska N, Wu X, Donato R, Wang Z, Ong E, Jones E, Forster J, Emmerling M, Sidoli A, OHehir R, Spangenberg G. Transgenic ryegrasses (*Lolium* spp.) with down-regulation of main pollen allergens. *Mol. Breed.*, **2005**; 14, 489–501.
- ✓ Pham B, Duval B, De Serres G, Gilca V, Tricco AC, Ochnio J, Scheifele DW. Seroprevalence of hepatitis A infection in a low endemicity country: a systematic review. *BMC Infect. Dis.*, **2005**; 5: 56.

- ✓ Piest M, Engbersen JF. Effects of charge density and hydrophobicity of poly(amido amine)s for non-viral gene delivery. *J. Control Release.*, **2010** in press.
- ✓ Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, *et al.* Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science.*, **2005**; 2;309(5740):1573-6.
- ✓ Ping LH, Jansen RW, Stapleton JT, Cohen JI, Lemon SM. Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**; 85(21): 8281-8285.
- ✓ Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.*, **1992**; 66(4): 2208-2216.
- ✓ Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Singh K. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J. Trop. Pediatr.*, **2002**; 48(4): 210-213.
- ✓ Probst C, Jecht M, Gauss-Muller V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J. Biol. Chem.*, **1999**; 274(8): 4527-4531.
- ✓ Provost P, Dishart D, Doucet J, Friendewey D, Samuelsson B, Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo. J.*, **2002**; 21(21):5864-74.
- ✓ Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1979**; 160(2): 213-221.
- ✓ Pruijn GJ. The RNA interference pathway: a new target for autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.*, **2006**; 8(4):110.
- ✓ Purcell RH, Wong DC, Moritsugu Y, Dienstag JL, Routenberg JA, Boggs JD. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J. Immunol.*, **1976**; 116(2): 349-356.
- ✓ Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100(1):183-8.
- ✓ Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**; 8(1):23-36.
- ✓ Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, **2005**; 123(4):621-9.
- ✓ Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100(1):235-40.
- ✓ Randall G, Rice CM. Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.*, **2004**; 1;102(1):19-25.

- ✓ Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, **2002**; 297(5588):1831.
- ✓ Reischl D, Zimmer A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*, **2009**; 5(1):8-20.
- ✓ Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.*, **1992**; 73 (Pt 6): 1365-1377.
- ✓ Rognant JY, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *Rna*, **2003**; 9(3):299-308.
- ✓ Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.*, **1992**; 6(22):3343-53.
- ✓ Rothe D, Werk D, Niedrig S, Horbelt D, Grunert HP, Zeichhardt H, *et al.* Antiviral activity of highly potent siRNAs against echovirus 30 and its receptor. *J. Virol. Methods*, **2009**; 157(2):211-8.
- ✓ Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.*, **2003**; 33(3):401-6.
- ✓ Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, *et al.* Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, **2006**; 127(6):1193-207.
- ✓ Sabbioni S, Callegari E, Manservigi M, Argnani R, Corallini A, Negrini M, *et al.* Use of herpes simplex virus type 1-based amplicon vector for delivery of small interfering RNA. *Gene Ther.*, **2007**; 14(5):459-64.
- ✓ Sánchez G, Pintó RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, **2002**; 40(11): 4148-4155.
- ✓ Sanchez G, Populaire S, Butot S, Putallaz T, Joosten H. Detection and differentiation of human hepatitis A strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests. *J. Virol. Methods*, **2006**; 132(1-2):160-5.
- ✓ Santos DR, Villar LM, Paula VS, Lima GS, Gaspar AM. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2008**; 103(3):254-8.
- ✓ Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*, **2003**; 82(3):323-30.
- ✓ Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci.*, **2002**; 7(11):487-91.

- ✓ Schmidt FR, Davis ND, Diener UL, Lemke PA. Cycloheximide induction of aflatoxin synthesis in a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Bio/Technology*, **1983**; 1(9):794-5.
- ✓ Schmidt FR. RNA interference detected 20 years ago? *Nat. Biotechnol.*, **2004**; 22(3):267-8.
- ✓ Schubert S, Rothe D, Werk D, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, *et al.* Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral Res.*, **2007**; 73(3):197-205.
- ✓ Schultheiss T, Kusov YY, Gauss-Muller V. Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology*, **1994**; 198(1): 275-281.
- ✓ Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100(11):6347-52.
- ✓ Seth S, Templin MV, Severson G, Baturevych O. A potential therapeutic for pandemic influenza using RNA interference. *Methods Mol. Biol.*, **2010**; 623:397-422.
- ✓ Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, **2003**; 37(4):764-70.
- ✓ Shrey K, Suchit A, Nishant M, Vibha R. RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**; 386(2):273-7.
- ✓ Siegl G, deChastonay J, Kronauer G. Propagation and assay of hepatitis A virus in vitro. *J. Virol. Methods.*, **1984**; 9(1): 53-67.
- ✓ Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **2001**; 107(4):465-76.
- ✓ Sijen T, Steiner FA, Thijssen KL, Plasterk RH. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, **2007**; 315(5809):244-7.
- ✓ Sim AC, Luhur A, Tan TM, Chow VT, Poh CL. RNA interference against enterovirus 71 infection. *Virology*, **2005**; 341(1):72-9.
- ✓ Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, *et al.* Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotechnol.*, **2005**; 23(2):227-31.
- ✓ Sioud M, Leirdal M. Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs. *Methods Mol. Biol.*, **2004**; 252:457-69.

- ✓ Sjogren MH, Tanno H, Fay O, Sileoni S, Cohen BD, Burke DS, *et al.* Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann. Intern. Med.*, **1987**; 106(2): 221-226.
- ✓ Skapenko A, Leipe J, Niesner U, Devriendt K, Beetz R, Radbruch A, *et al.* GATA-3 in human T cell helper type 2 development. *J. Exp. Med.*, **2004**; 199(3):423-8.
- ✓ Skinhoj P, Mathiesen LR, Kiryger P, Moller AM. Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand. J. Gastroenterol.*, **1981**; 16: 1057–1059.
- ✓ Skinhoj P, Mikkelsen F, Hollinger FB. Hepatitis A in Greenland: importance of specific antibody testing in epidemiologic surveillance. *Am. J. Epidemiol.*, **1977**; 105(2): 140-147.
- ✓ Sledz CA, Williams BR. RNA interference in biology and disease. *Blood*, **2005**; 106(3):787-94.
- ✓ Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell.*, **2004**; 15(2):173-83.
- ✓ Stapleton JT, Lange DK, LeDuc JW, Binn LN, Jansen RW, Lemon SM. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.*, **1991**; 163(1): 7-11.
- ✓ Stapleton JT, Lemon SM. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. *J. Virol.*, **1987**; 61(2): 491-498.
- ✓ Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.*, **1995**; 171 Suppl 1: S9-S14.
- ✓ Steffen R, Kane MA, Shapiro CN, Billo N, Schoellhorn KJ, van Damme P. Epidemiology and prevention of hepatitis A in travelers. *JAMA*, **1994**; 272(11): 885-889.
- ✓ Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**; 75(1):285-8.
- ✓ Stram Y, Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes*, **2006**; 32(3):299-306.
- ✓ Strazynski M, Kramer J, Becker B. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**; 74(1-2): 73-78.
- ✓ Sundkvist T, Aitken C, Duckworth G, Jeffries D. Outbreak of acute hepatitis A among homosexual men in East London. *Scand. J. Infect. Dis.*, **1997**; 29(3): 211-212.
- ✓ Taft RJ, Kaplan CD, Simons C, Mattick JS. Evolution, biogenesis and function of promoter-associated RNAs. *Cell Cycle*, **2009**; 8(15):2332-8.

- ✓ Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Hidajat R, Tanaka M, Mizuta H, *et al.* Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol. Immunol.*, **2004**; 48(8):591-8.
- ✓ Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, *et al.* Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, **2008**; 22;453(7194):534-8.
- ✓ Tan EL, Tan TM, Chow VT, Poh CL. Enhanced potency and efficacy of 29-mer shRNAs in inhibition of Enterovirus 71. *Antiviral Res.*, **2007**; 74(1):9-15.
- ✓ Tan EL, Wong AP, Poh CL. Development of potential antiviral strategy against coxsackievirus B4. *Virus Res.*, **2010**; 150(1-2):85-92.
- ✓ Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine*, **2000**; 18 Suppl 1: S57-S60.
- ✓ Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR, Purcell RH. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J. Infect. Dis.*, **1986**; 154(2): 231-237.
- ✓ Tchurikov NA, Kretova OV. Suffix-specific RNAi leads to silencing of F element in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.*, **2007**; 2(5):e476.
- ✓ Tenllado F, Martinez-Garcia B, Vargas M, Diaz-Ruiz JR. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol.*, **2003**; 3:3.
- ✓ Tokatlian T, Segura T. siRNA applications in nanomedicine. *Wiley. Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol.*, **2010**; 2(3):305-15.
- ✓ Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, **2004**; 306(5700):1377-80.
- ✓ Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.*, **2005**; 1;19(5):517-29.
- ✓ Totsuka A, Moritsugu Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*, **1999**; 42(2-3): 63-68.
- ✓ Tsarev SA, Emerson SU, Balayan MS, Ticehurst J, Purcell RH. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J. Gen. Virol.*, **1991**; 72 (Pt 7):1677-83.
- ✓ Vaishnaw AK, Gollob J, Gamba-Vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, *et al.* A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, **2010**; 1(1):14.
- ✓ Van den Anker JN, Sukhai RN, Dumas AM. Relapsing hepatitis in a child, associated with isolation of hepatitis A virus antigen from the liver. *Eur. J. Pediatr.*, **1988**; 147(3): 333.



- ✓ Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell.*, **1990**; 2(4):291-9.
- ✓ Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100(16):9632-6.
- ✓ Vasconcelos GA. Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas: Aplicação em diagnóstico do vírus no fígado. Dissertação de Mestrado, **2010**.
- ✓ Villar LM, Esteves da Costa Mdo C, de Paula VS, Gaspar AM. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2002**; 97(3): 301-305.
- ✓ Villar LM, Lampe E, Meyer A, Gaspar AM. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz J Med Biol Res.*, **2004**; 37(12):1779-87.
- ✓ Villar LM, Morais LM, Aloise R, Melo MM, Calado IA, Lampe E, et al. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.*, **2006**; 39(7):873-81.
- ✓ Vitral CL, Gaspa AM, Souto FJ. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2006**; 101(2): 119-127.
- ✓ Vitral CL, Souto FJ, Gaspar AM. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat.*, **2008**; 15 Suppl 2:22-5.
- ✓ Voegt H. Zur aetiologie der hepatitis epidemica. Muench. *Med. Wochenschr.*, **1942**; 89: 76–79.
- ✓ Walder RY, Walder JA. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**; 85(14):5011-5.
- ✓ Wang CH, Tschen SY, Heinrich U, Weber M, Flehmig B. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection. *J. Clin. Microbiol.*, **1996**; 34(3): 707-713.
- ✓ Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, et al. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2004**; 101(9):3275-80.
- ✓ Wang YY, Li Z, Jiao D, Zhang Z, Shao X, Yuan J, et al. RNA Interference Reveals a Requirement for Both p18INK4c and p27Kip1 in B Lymphopoiesis. *J Mol. Cell. Biol.*, **2010**; 2(4):209-16.
- ✓ Wasley A, Samandari T, Bell BP. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA*, **2005**; 294(2): 194-201.
- ✓ Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the

- mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.*, **2006**; 1;20(13):1732-43.
- ✓ Weber DJ, Barbee SL, Sobsey MD, Rutala WA. The effect of blood on the antiviral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quaternary ammonium compound. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **1999**; 20(12): 821-827.
  - ✓ Weinberg MS, Arbutnot P. Progress in the use of RNA interference as a therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Genome Med.*, **2010**; 2(4):28.
  - ✓ Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, Ticehurst JR, Purcell RH. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J. Virol.*, **1986**; 60(1): 124-130.
  - ✓ Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.*, **2001**; 27(6):581-90.
  - ✓ Westerhout EM, Ooms M, Vink M, Das AT, Berkhout B. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res.*, **2005**; 33(2):796-804.
  - ✓ World Health Organization (WHO). Hepatitis A vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, **2000**; 75(5): 38-44.
  - ✓ Wu CJ, Huang HW, Liu CY, Hong CF, Chan YL. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res.*, **2005**; 65(1):45-8.
  - ✓ Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.*, **2003**; 63(7):1515-9.
  - ✓ Wu Z, Yang F, Zhao R, Zhao L, Guo D, Jin Q. Identification of small interfering RNAs which inhibit the replication of several Enterovirus 71 strains in China. *J. Virol. Methods*, **2009**; 159(2):233-8.
  - ✓ Xiong GS, Sun HL, Wu SM, Mo JZ. Small interfering RNA against the apurinic or apyrimidinic endonuclease enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro. *J. Dig. Dis.*, **2010**; 11(4):224-30.
  - ✓ Xu P, Vernoooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.*, **2003**; 29;13(9):790-5.
  - ✓ Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, et al. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res.*, **2009**; 69(16):6531
  - ✓ Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, **2003**; 17(24):3011-6.

- ✓ Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, *et al.* Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, **2006**; 127(4):747-57.
- ✓ Ying RS, Zhu C, Fan XG, Li N, Tian XF, Liu HB, *et al.* Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res.*, **2007**; 73(1):24-30.
- ✓ Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, *et al.* Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.*, **2003**; 4(6):602-8.
- ✓ Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K, Yasuda K, Hino K, Kurokawa K. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **1993**; 40(1): 35-38.
- ✓ Yuan J, Cheung PK, Zhang HM, Chau D, Yang D. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. *J. Virol.*, **2005**; 79(4):2151-9.
- ✓ Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**; 75(1):280-4.
- ✓ Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.*, **2004**; 32(16):4776-85.
- ✓ Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo. J.*, **2002**; 21(21):5875-85.
- ✓ Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, Kobayash N, Qin-Chang Z, Pei-Zhuo Z, *et al.* Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch. Virol.*, **2008**; 153(7):1401-6.
- ✓ Zhiqiang W, Yaowu Y, Fan Y, Jian Y, Yongfeng H, Lina Z, *et al.* Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Res.*, **2010**; 85(3):559-61.
- ✓ Zou S, Chaudhary RK. Kinetic study of the replication of a cell-culture-adapted hepatitis A virus. *Res. Virol.*, **1991**; 142(5):381-5.