

Paola Jocelan Scarin Provazzi

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DA SERINO-
PROTEASE NS3 EM PACIENTES INFECTADOS COM O
VÍRUS DA HEPATITE C DO GENÓTIPO 3**

U N E S P



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de São José do Rio Preto

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Programa de Pós Graduação em Genética

Paola Jocelan Scarin Provazzi

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DA SERINO-
PROTEASE NS3 EM PACIENTES INFECTADOS COM O
VÍRUS DA HEPATITE C DO GENÓTIPO 3**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, para obtenção do Título de Doutor em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

São José do Rio Preto, SP.

2008

Paola Jocelan Scarin Provazzi

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DA SERINO-
PROTEASE NS3 EM PACIENTES INFECTADOS COM O
VÍRUS DA HEPATITE C DO GENÓTIPO 3**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2° Examinador:

3° Examinador:

4° Examinador:

5° Examinador:

São José do Rio Preto, ____/____/2008

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, SP, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Paulo e Jocelen

“...procuro explicar o meu sentimento e só consigo encontrar palavras que não existem no dicionário...”

Dedico também...

Ao meu esposo, Antônio Fernando

“...e no meio de tanta gente eu encontrei você, entre tanta gente chata e sem nenhuma graça...”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal a quem admiro muito por sua conduta profissional e pessoal. Muitas vezes foi mais que uma orientadora e por isso agradeço imensamente. Agradeço aos conhecimentos e as oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dadas todos esses anos. Agradeço ainda a amizade, os incentivos e cada palavra amiga. Obrigada, por confiar em mim e acreditar no meu trabalho.

Aos pacientes portadores de Hepatite C pela disponibilidade em serem incluídos neste estudo, pois sem eles não seria possível à realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Hamilton Cabral, Prof. Dr. Nelson J. F. da Silveira, Prof. Dr. José O. Gaspar e Profa. Dra. Maria Tercília V. A. Oliveira pela aceitação e disponibilidade em avaliar o trabalho.

À Dra. Helen Andrade Arcuri pela execução das análises de Bioinformática e ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma por ter aberto o seu laboratório e disponibilizados as suas máquinas.

À Dra. Isabel Maria V. G. C. Mello e Dr. João Renato R. Pinho pela contribuição e aprimoramento deste trabalho.

À doutoranda Camila Arnaldo Olhê Dias pelos experimentos com expressão de proteínas e ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini por me receber em seu laboratório.

À Profa. Dra Fátima Pereira de Souza, pela contribuição na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Tercília V. A Oliveira por ter sido a minha primeira orientadora de estágio básico e despertado em mim o interesse pela pesquisa.

Aos professores do Departamento de Biologia e da Pós-Graduação em Genética, pela minha formação acadêmica, atenção e colaboração nos momento que precisei.

À coordenadora e a vice-coordenadora do Programa de Pós Graduação, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingues e Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela atenção e disponibilidade nos problemas burocráticos e preocupação constante na nossa formação acadêmica. Também agradeço a todos o membros do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Genética.

Aos funcionários da Pós Graduação, em especial a Rosemar, Rosana e Sílvia pela ajuda e colaboração nos diversos problemas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e principalmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro e iniciativa em incentivar as pesquisas no Brasil.

À Lenira por sempre me receber com sorriso todas as vezes em que bati à sua porta, e por sua disponibilidade em me ajudar em todos os momentos que precisei.

À Carolzinha Bonfim pela boa vontade e disponibilidade em realizar o sequenciamento de todas as amostras produzidas neste trabalho.

Aos alunos de estágio básico e Iniciação Científica pelos bastidores da pesquisa, principalmente Valéria e Lílian Yamasaki pelas células competentes, meios de cultura, géis, minipreps...

À Erica Babeto pelos incentivos, palavras amigas e anos de amizade e companheirismo.

À Marília Calmom pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos em que precisei.

À Marina e Lílian Pires principalmente pelo apoio nessa fase final em que nos aproximamos mais.

À Cíntia pela contribuição com as análises filogenéticas e também pela amizade.

À todos os amigos do Laboratório de Estudos Genômicos Jucimara, Marília, Erica, Cíntia, Carol Jardim, Carol Bonfim, Lílian Pires, Lílian Yamasaki, Marina, Fernanda, Marcelo, Paulo, Valéria, André, Felipe e Paulinho, que direta ou indiretamente me ajudaram na concretização deste trabalho. Obrigado pela convivência e pelos bons momentos vividos. Sem eles, cada um a seu modo, certamente tudo teria sido mais difícil.

Às minhas queridas amigas Melissa e Nedenia pela grande amizade construída, pelo apoio nos momentos difíceis e por tudo que compartilhamos nesses anos. À vocês agradeço os momentos de descontração durante nossos agradáveis almoços e happy hours, as nossas conversas e palavras amigas.

À minha irmã Alessandra por me ensinar que com determinação e força de vontade é possível construir um castelo a partir de uma ruína de pedras. Essa é umas de suas lições que carrego comigo. Agradeço também ao amor dedicado a mim, a amizade, ao companheirismo e a sua presença constante em minha vida.

Ao meu irmão Alexandre pelas lições de força, obstinação, determinação e humildade. Agradeço também ao amor dedicado a mim, a amizade ao companheirismo e a sua presença constante em minha vida.

Ao meu marido Antônio Fernando por respeitar a minha independência e a minha individualidade. Agradeço também por me ajudar a ver o mundo pelos meus próprios olhos e a sorrir mesmo diante de uma grande dificuldade. Agradeço também ao apoio, ao incentivo e ao amor dedicados a mim.

Aos meus pais por me darem a vida e a torná-la tão feliz. Agradeço ao apoio incondicional, aos incentivos, a dedicação a mim, as lições diárias de amor, ao carinho e aos valores que me foram passados dos quais me orgulho muito. Obrigada pela presença constante em minha vida e enfim, obrigada por tudo.

À Deus.

Os meus sinceros agradecimentos

**“BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINÇÃO, ABRAÇAR A VIDA E VIVER
COM PAIXÃO, PERDER COM CLASSE E VIVER COM OUSADIA. POIS O
TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE, E A VIDA É MUITO BELA PARA SER
INSIGNIFICANTE”**

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução	13
I) Epidemiologia do HCV e levantamento clínico da patologia.....	14
II) Diversidade do genoma viral.....	19
III) Organização do genoma de HCV.....	22
IV) Processamento da poliproteína precursora viral.....	24
V) Características das proteínas virais.....	26
V.1) Proteína Capsidial.....	26
V.2) Glicoproteínas do envelope: E1 e E2.....	26
V.3) Proteína p7.....	27
V.4) Proteína NS2.....	27
V.5) Proteína S3/44A.....	28
V.5.1) Protease NS3/44A.....	28
V.5.2) Inibidores para a protease NS3/4A.....	35
V.5.3) Helicase NS3.....	38
V.5.4) Inibidores para a helicase NS3.....	46
V.5.4.1) Inibidores baseados em ácidos nucleicos.....	47
V.5.4.2) Anticorpos.....	49
V.6) Proteína NS4B.....	51
V.7) Proteína NS5A.....	52
V.8) Proteína NS5B.....	53
VI) O ciclo replicativo.....	53
Objetivos	59
Capítulo II – Artigo Original	61
Capítulo III – Discussão	102
Capítulo IV – Conclusões	112
Referências Bibliográficas	114
Resumo	131
Abstract	133
Outras Produções Científicas	135

Introdução

1) Epidemiologia do HCV e levantamento clínico da patologia.

O vírus da hepatite C (HCV) pertence ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. Sua estrutura tem sido objeto de estudo desde a sua identificação mas apesar dos grandes avanços obtidos por meio da comparação entre as estruturas de vírus relacionados, por exemplo, o vírus da Dengue (Kuhn *et al.*, 2002) o HCV não foi definitivamente visualizado e sua estrutura precisa ainda ser elucidada. Baseado em estudos de filtração e microscopia eletrônica, foi possível determinar que partículas do HCV desenvolvidas em cultura celular são esféricas, apresentam densidade entre 1.15 e 1.17 g/ml e possuem um diâmetro aproximado de 55nm (Wakita *et al.*, 2005).

O HCV é um vírus envelopado no qual a proteína capsidial e as glicoproteínas do envelope E1 e E2 são os principais constituintes da partícula viral. O envelope envolve o nucleocapsídeo composto por múltiplas cópias do RNA genômico e da proteína Capsidial (Figura 1).

A partícula viral circula sob várias formas no soro do hospedeiro infectado, incluindo (i) vírions ligados a LDL (*low density lipoproteins*), e a VLDL (*very low density lipoproteins*), os quais parecem representar a fração infecciosa; (ii) vírions ligados a imunoglobulinas; e (iii) vírios livres (Thomssen *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1999).

Apresenta taxa pelo fígado, sendo o responsável pelas hepatites agudas e crônicas, cirrose e carcinoma hepatocelular (Kato, 2001). Infecta somente humanos e chimpanzés no qual os hepatócitos são os principais alvos celulares embora também tenha sido descrita a infecção das células B e células dendríticas.

O HCV foi identificado a nível molecular no final da década de 1980, o qual correspondia a cerca de 90% dos casos de hepatites pós-transfusionais historicamente conhecidas por hepatites não-A e não-B (NANB) no mundo (Choo *et al.*, 1989).

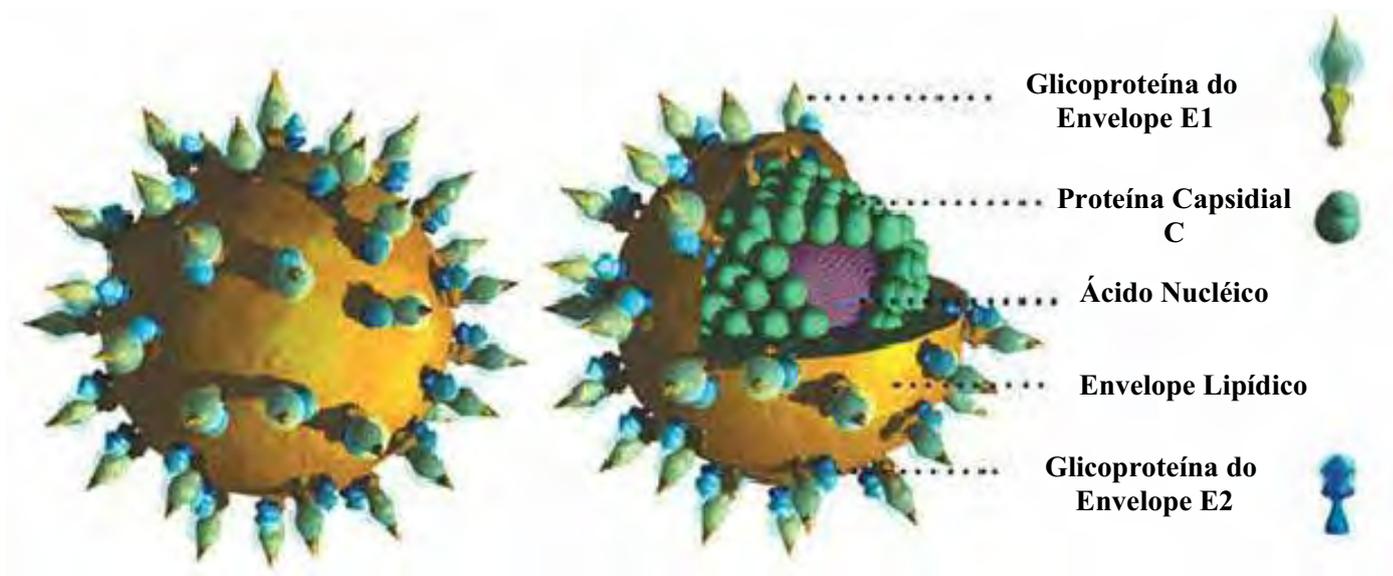


Figura 1: Estrutura do vírus HCV evidenciando os principais constituintes da partícula viral. (Modificado de Physicians' Research Network, 2004).

O modo de transmissão mais eficiente do vírus HCV é por meio da exposição percutânea direta ao sangue de indivíduos portadores tais como, transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos a partir de doadores infectados, e uso de drogas injetáveis (Prati, 2006).

A transmissão do HCV é menos eficiente quando ocorre por pequenas exposições percutâneas como acidente com agulhas contaminadas em ocupação profissional (Prati, 2006) ou exposição da mucosa a sangue ou fluidos derivados de sangue, tais como exposição do feto ao sangue da mãe portadora no momento do parto e relação sexual com parceiro contaminado (Terrault *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2007).

Já a transmissão sexual ainda é um assunto controverso. Um estudo recente com casais infectados encontrou evidências de que as cepas encontradas em ambos os cônjuges possuíam a mesma origem, contudo não há como avaliar se a contaminação ocorreu por via sexual ou outra forma de contato próximo (Mello, 2006).

A estimativa global da prevalência da infecção pelo HCV é de 2,2% o que corresponde a 130 milhões de pessoas HCV positivas no mundo (WHO, 2004). A infecção apresenta uma distribuição universal. Estimativas região-específicas variam de menos de 1,0% no norte da Europa a mais de 2,9% no norte da África. A menor prevalência (0,01% a 0,1%) foi reportada nos países do Reino Unido e Escandinávia; a maior prevalência (15% a 20%) foi reportada no Egito (Frank *et al.*, 2000; Shepard *et al.*, 2005;).

Existem diferenças tanto geográficas quanto temporais nos padrões de infecção pelo vírus (Alter *et al.*, 1999). Por exemplo, países localizados distantemente uns dos outros como, Estados Unidos, Austrália, Turquia, Espanha, Itália e Japão, pertencem a regiões do mundo com média de prevalência de infecção pelo vírus similares (1,0% a 1,9%), mas apresentam padrões diferentes na prevalência em relação a idade das pessoas infectadas.

Nos Estados Unidos a maior prevalência está entre as pessoas de 30 a 40 anos e a menor entre as pessoas com menos de 20 e mais de 50 anos de idade (Alter *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 2006). Este padrão indica que a maioria das transmissões ocorreram nos últimos 20 a 40 anos entre adultos jovens, um padrão similar ao observado na Austrália (Law *et al.*, 2003). Em contraste, foi observado um aumento na prevalência de infecção pelo HCV em relação a idade na Turquia, Espanha, Itália,

Japão e China (Sun *et al.*, 1999; Dominguez *et al.*, 2001; Campello *et al.*, 2002; Sagnelli *et al.*, 2005), o que sugere exposição anterior ao vírus.

Os fatores de risco envolvidos na infecção pelo vírus HCV no qual estão associados altas taxas de prevalência são: pacientes hemofílicos, hemodialisados, talassêmicos (Ramia *et al.*, 2002), toxicômanos, recém-nascidos de mães infectadas e receptores de múltiplas transfusões de sangue (Ansar & Kooloobandi, 2002).

No Brasil, assim como em outros países da América Latina, existem poucos dados disponíveis a respeito da epidemiologia do vírus HCV. A estimativa, segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH), é de 1,6% na população em geral, porém em hemofílicos a taxa de infecção chega a 87,3%, enquanto em pacientes hemodialisados observa-se um índice variante entre 19-47,2% (<http://www.sbhepatologia.org.br>). A prevalência do HCV foi investigada por Nascimento e colaboradores, em 2008, que avaliaram 3591 doadores de sangue de três cidades brasileiras: São Paulo, Manaus e Salvador. A soroprevalência observada foi de 0,97% (12/1238) para mulheres e 0,38% (9/2353) para homens. Com o mesmo objetivo, Toledo e colaboradores, em 2005, avaliaram a prevalência do vírus HCV entre voluntários do serviço militar em todo o Brasil. Foram avaliados 5508 homens com idades entre 17 e 22 anos. Os resultados obtidos mostram que 1,5% dos voluntários (80/5508) apresentaram anticorpos anti-HCV. A prevalência nas cinco macro regiões brasileiras também foi avaliada e mostra para região Norte 2,3%, Nordeste: 0,6%, Centro-Oeste: 0,6%, Sudeste: 1,2% e Sul: 2,5%. Entre pacientes que realizam hemodiálise, Carneiro e colaboradores, em 2007, evidenciaram anticorpos

anti-HCV e/ou RNA do vírus em 16,4% dos 180 pacientes atendidos em 15 centros de hemodiálise no estado de Goiás.

Os indivíduos infectados raramente apresentam infecção aguda sintomática. Calcula-se que cerca de 80% dos indivíduos afetados desenvolvem uma infecção crônica assintomática que pode desenvolver-se em cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Shimotohno, 2000). O período entre a infecção por HCV e o desenvolvimento do hepatocarcinoma, é em média 30 anos, sendo que para o desenvolvimento da hepatite crônica leva-se em torno de 13 anos e de cirrose hepática 20 anos (Montalto *et al.*, 2002). A hepatite C é a principal indicação de transplante de fígado no mundo todo (Terrault, 2000).

Os sintomas são raros na fase aguda e, em geral, caracterizam-se por febre, anorexia, náuseas, vômito, icterícia, urina escura, fezes claras, e a freqüente presença de níveis elevados de transaminase. As infecções assintomáticas são detectadas a partir de testes sorológicos para a presença de anticorpos contra o HCV (ELISA), e/ou então a partir de testes moleculares (HCV-RNA qualitativo ou quantitativo) (Alter, 1997).

O tratamento padrão para hepatite C é a combinação do Interferon Peguilado (PEG IFN) com Ribavirina (RBV), o qual tem aumentando o percentual de pacientes que obtiveram uma Resposta Viroológica Sustentada (RVS). Contudo, após a administração da terapia combinada, a RVS não é alcançada em 40% a 50% dos pacientes do genótipo 1 e em 30% dos pacientes com genótipo 2 ou 3 (Heathcote *et al.*, 2004). Dados recentes mostram que aproximadamente 18% dos pacientes que não obtiveram resposta ao tratamento padrão com Interferon com ou sem Ribavirina,

alcançaram uma resposta virológica sustentada quando tratadas com PEG IFN e Ribavirina (Shiffman *et al.*, 2004).

Há limitadas opções terapêuticas disponíveis para pacientes com hepatite C crônica que não respondem ao tratamento padrão. Uma opção é retratar o paciente com uma segunda série de PEG IFN e RBV (Cheruvattath *et al.*, 2007). Com isso, a melhor estratégia para o controle da hepatite C baseia-se na educação, prevenção e redução do comportamento de risco (De Francesco, *et al.*, 2003).

II) Diversidade do genoma viral

A variabilidade genética do genoma viral tornou possível distinguir o HCV em seis genótipos (numerados de 1 a 6) e em mais de 70 subtipos (Simmonds *et al.*, 2005). Cada um dos 6 genótipos é igualmente divergente, e diferem entre si 31-34% de nucleotídeos na seqüência genômica (Bourliere *et al.*, 2002; Pawlotsky, 2003). Em adição aos genótipos, o HCV existe dentro do hospedeiro como um conjunto de variantes próximas mas distintas geneticamente, chamadas quasiespécies (Weiner *et al.*, 1991; Martell *et al.*, 1992).

Os subtipos também apresentam características particulares como resistência ao tratamento combinado com PEG IFN mais Ribavirina. Deste modo, pacientes infectados com o vírus do genótipo 1, respondem menos eficientemente a terapia que aqueles infectados com vírus dos genótipos 2 e 3. Por outro lado, pacientes portadores do vírus do genótipo 3 e que apresentam Hepatite C crônica, estão mais sujeitos a

desenvolverem esteatose, caracterizada pelo depósito de gordura no fígado, do que aqueles infectados com o HCV do genótipo 1 (Lonardo *et al.*, 2006).

Os determinantes das diferenças associadas aos genótipos virais ainda não estão bem compreendidos. Foi sugerido que variações nas seqüências das glicoproteínas do envelope E1 e E2 podem estar envolvidas nas diferenças na patologia dos genótipos 1 e 3 (Shaw *et al.*, 2003). Mais recentemente, modelos *in vitro* sugerem o envolvimento da proteína capsidial como um fator viral associado ao acúmulo de lipídeos na infecção pelo genótipo 3, daí a associação com esteatose (Abid *et al.*, 2005; Hourieux *et al.*, 2007). Algumas propriedades inerentes a região 5'UTR do genoma viral do tipo 3 foram demonstradas por Masante e colaboradores em 2008:

- (i) A análise das seqüências revelou que sete nucleotídeos não contíguos dentro da 5'UTR nas posições 8, 13, 14, 70, 97, 203 e 224, distinguem o genótipo 3 dos outros e
- (ii) esta assinatura parece estar envolvida em uma replicação menos eficiente do RNA do genótipo 3 quando comparado ao genótipo 1.

Os seis genótipos virais também apresentam diferenças quanto a distribuição geográfica, no qual os genótipos 1, 2 e 3 possuem distribuição universal (Campiotto *et al.*, 2005).

O genótipo 1 predomina nos Estados Unidos, Japão, Europa e América Latina e é o mais freqüente em nosso país, apresentando maior prevalência nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste (Campiotto *et al.*, 2005). Está freqüentemente associado com a forma mais severa da doença, progressão para cirrose ou carcinoma hepatocelular e alta resistência ao tratamento antiviral (Simmonds *et al.*, 1996). O tratamento combinado do Interferon- α com a Ribavirina resulta em uma resposta positiva em

40% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 e em aproximadamente 80% dos pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3 (Chander *et al.*, 2002).

O genótipo 3 tem maior prevalência na América do Sul e em alguns países da Europa, como França (Campiotto *et al.*, 2005), onde está frequentemente associado ao uso de drogas endovenosas (Dusheiko *et al.*, 1994; Pontisso *et al.*, 1995). No Brasil o genótipo 3 também apresenta uma alta incidência em relação a outras regiões no mundo, apresentando maior prevalência na região Sul (Campiotto *et al.*, 2005).

O genótipo 4 é endêmico no Egito e encontrado em outros países da África e Oriente Médio (Campiotto *et al.*, 2005). Está associado a uma baixa resposta ao tratamento antiviral (Mellor *et al.*, 1996; Prescott *et al.*, 1996).

O genótipo 5 é o principal na África do Sul e o genótipo 6 e seus variantes tem sido encontrados principalmente na Ásia. Não há evidências da resposta dos genótipos 5 e 6 ao tratamento com Interferon (Parana *et al.*, 2000).

No Brasil que é um país de dimensões continentais a grande diferença populacional se reflete na variação na frequência dos genótipos do vírus. Isto foi observado por Campiotto e colaboradores, em 2005, que avaliaram 1688 amostras de RNA provenientes de pacientes com hepatite C crônica coletadas de 1995 a 2000, em diferentes laboratórios localizados em diferentes cidades brasileiras. As seqüências foram analisadas para determinação dos genótipos e as frequências observadas foram as seguintes: 64,9% (1095) para o genótipo 1; 4,6% (78) para o genótipo 2; 30,2 (510) para o genótipo 3; 0,2% (3) para o genótipo 4 e 0,1% (2) para o genótipo 5. As frequências para os genótipos do HCV foram estatisticamente diferentes entre as regiões brasileiras ($P=0,00017$). Em todas as regiões, o genótipo 1 foi o mais frequente

(51,7 a 74,1%), atingindo o maior valor na região Norte; o genótipo 2 foi o mais prevalente na região Centro-Oeste (11,4%), especialmente no estado do Mato Grosso (25,8%), enquanto o genótipo 3 foi o mais comum no Sul (43,2%). Os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados e ocorreram somente na região Sudeste, no Estado de São Paulo.

III) Organização do genoma de HCV

O vírus da hepatite C contém um genoma de RNA fita simples positiva com aproximadamente 9.6 kb. Apresenta uma “open reading frame” (ORF) flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTR). Esta ORF codifica uma única poliproteína precursora que contém de 3008 a 3037 aminoácidos (Choo *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1990; Takamizawa *et al.*, 1991).

O processamento da poliproteína precursora de HCV ocorre durante e após a tradução por proteases de sinal celular e pelas proteases virais NS2-NS3 e NS3 (Hijikata *et al.*, 1993) (Figura 2). As proteínas estruturais, que formam as partículas virais, estão localizadas na extremidade amino-terminal da proteína precursora na seguinte ordem: capsidial (proteína C), envelope 1 (E1), e envelope 2 (E2). Na sequência vêm as proteínas não estruturais (NS) localizadas na seguinte ordem: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Hijikata *et al.*, 1993).

HCV RNA

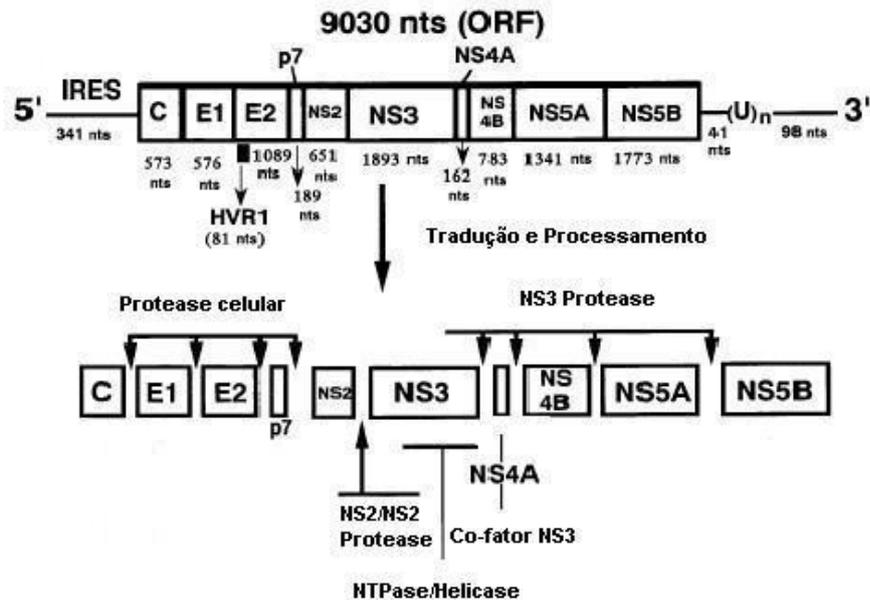


Figura 2: Estrutura do genoma de HCV e sumário do processamento da poliproteína. A representação esquemática da estrutura do genoma de HCV está mostrada na parte superior. Nts, nucleotídeos; HRV1, região hipervariável 1; IRES, sítio de entrada no ribossomo. Os sítios de clivagem para as proteases são indicados pelas setas. As proteínas processadas são indicadas pelo nome. (Kato, 2001).

A porção não traduzida na extremidade 5' (5'UTR) consiste de 341 nucleotídeos cuja seqüência é altamente conservada (com uma identidade de mais de 92%) entre as cepas virais, sugerindo que a 5'UTR tem uma participação importante em processos chaves como a replicação do genoma viral e a tradução das proteínas virais.

Foi evidenciado que a 5'UTR possui um sítio de entrada no ribossomo chamado IRES que estruturalmente é constituído pelos domínios I, II, III e IV da região 5'UTR mais os primeiros 24-40 nucleotídeos da região codificadora da proteína

capsidial, formando uma estrutura essencial para a tradução do RNA viral (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993). A entrada no ribossomo do RNA viral é mediado pelo IRES e ocorre a poucos nucleotídeos acima do códon iniciador AUG. A subunidade 40S é posicionada em contato com AUG por meio dos domínios II e III. A ligação do eIF3 ao IRES e a subunidade ribossomal 40S cria um complexo que coloca AUG em contato com o anti-codon Met-tRNA (Collier *et al.*, 2002). A ligação ao IRES induz a uma alteração significativa na conformação da subunidade 40S, indicando que esta região do genoma viral controla a maquinaria de tradução no hospedeiro (Beales *et al.*, 2001; Spahn *et al.*, 2001).

A porção não traduzida na extremidade 3'UTR é constituída por uma seqüência pouco conservada de aproximadamente 40 nucleotídeos, uma região poli U (polipirimidina) e uma seqüência única de 98 nucleotídeos (Tanaka *et al.*, 1996; Kolykhalov *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1996). Esta última seqüência é altamente conservada entre as cepas virais de HCV, mesmo entre os dois tipos mais distantes geneticamente, HCV1b e HCV2a (Tanaka *et al.*, 1996); esta seqüência pode se dobrar em uma estrutura *stem-and-loop* (Tanaka *et al.*, 1996, Blight *et al.*, 1997).

IV) Processamento da poliproteína precursora viral.

O produto da tradução do genoma do vírus é a poliproteína precursora que é produzida a partir da ORF do genoma do HCV (Figura 2). Esta poliproteína é processada no Retículo Endoplasmático (RE), durante e após a tradução por proteases virais e celulares, para dar origem às 10 proteínas virais (Lindenbach *et al.*, 2006). As

proteínas estruturais incluem a proteína Capsidial, que forma o capsídeo viral e as glicoproteínas do envelope. Elas são liberadas pelas proteases de sinal da célula hospedeira (Hijikata *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994). Estas proteínas são separadas das proteínas não estruturais pelo peptídeo de membrana p7. As proteínas não estruturais (NS) NS2-NS5B estão envolvidas no processamento da poliproteína e na replicação viral. O processamento proteolítico das proteínas não estruturais é complexo e requer duas proteases distintas: (i) a metaloprotease dependente de zinco NS2/NS3 e (ii) a serino-protease NS3 localizada na porção N-terminal da NS3 (Hijikata *et al.*, 1993; Grakoui *et al.*, 1993; Selby *et al.*, 1993). A metaloprotease NS2/NS3 dedica-se apenas a clivar entre NS2/NS3 por meio de um mecanismo autocatalítico (Hijikata *et al.*, 1993). A seqüência de aminoácidos ao redor do sítio de clivagem, (NH₂) Leu-Leu/Ala-Pro-Ile-Thr (COOH), é conservada entre cepas de HCV (Bartenschlager *et al.*, 1994). As proteínas não estruturais restantes são liberadas pela protease NS3 associada com o seu co-fator NS4. A serino protease NS3 cliva o sítio entre NS3 e NS4 por meio de uma ação *cis* (evento intramolecular) enquanto essa enzima cliva outras junções (NS4A/4B, NS4B/5A e NS5A/5B por meio de uma ação *trans* (evento intermolecular) (Bartenschlager *et al.*, 1994).

Em síntese, pelo menos seis proteínas não estruturais: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B são produzidas a partir da região não estrutural do genoma de HCV através da ação das proteases NS2-NS3 e NS3 (Selby, 1993). Ainda, o processamento da proteína precursora de HCV produz pelo menos dez produtos distintos, na seguinte ordem: NH₂-Capsidial-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Kato, 2001).

V) Características das proteínas virais

V.1) Proteína capsidial

A proteína capsidial que é derivada da porção N-terminal da poliproteína, forma o nucleocapsídeo viral. Sua sequência de aminoácidos é altamente conservada entre diferentes cepas virais, quando comparada a outras proteínas do HCV. A proteína capsidial foi extensivamente usada em ensaios sorológicos já que anticorpos anti-capsidial são altamente prevalentes em indivíduos infectados. Embora a proteína Capsidial com variados pesos moleculares tenham sido identificadas (Harada *et al.*, 1991; Yasui *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2001), ela é liberada como um precursor de 191 resíduos e 23 kDa e processamentos adicionais produzem a forma predominante de 21kDa. O domínio N-terminal é altamente básico, enquanto o domínio C-terminal é hidrofóbico. Vários grupos reportaram uma localização intracelular complexa da proteína Capsidial (Harada *et al.*, 1991; Okuda *et al.*, 2002; Schwer *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005), que é primariamente detectada no citoplasma associada ao retículo Endoplasmático (RE), as gotículas lipídicas e também mitocôndria (Suzuki *et al.*, 2005). Em alguns estudos, uma fração da proteína Capsidial foi encontrada no núcleo (Schwer *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005).

V.2) Glicoproteínas do envelope: E1 e E2.

A proteínas E1 e E2 são componentes essenciais do envelope viral e são necessárias para entrada do vírus na célula hospedeira. Estas proteínas glicosiladas

estendem-se do aminoácido 192 ao 383 (E1) e do aminoácido 384 ao 746 (E2) da poliproteína, e tem massa moleculares de 33 a 35 e 70 a 72 kDa, respectivamente (Op De Beeck *et al.*, 2000). Foi sugerido que as formações transmembrânicas C-terminal de E1 e E2 formam uma estrutura em forma de grampo que passa duas vezes através da membrana, ficando susceptível à peptidase de sinal no lúmen do RE (Cocquerel *et al.*, 2003). Após a clivagem da poliproteína, realizada pela peptidase de sinal, a extremidade C-terminal desloca-se para o citoplasma em condições de gerar a topologia madura de membrana de E1 e E2 (Nakai *et al.*, 2006).

V.3) Proteína p7.

A proteína p7 é um pequeno polipeptídeo hidrofóbico (63 aminoácidos) que adota uma *double membrane-spanning* topologia, no qual suas extremidades N e C-terminal ficam voltadas para o lúmen do RE (Sakai, *et al.*, 2003). Dados recentes indicam que p7 pode mediar a permeabilidade de íons na membrana (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003), sugerindo que esta proteína pertença à família das viroporinas e pode apresentar um importante papel na maturação e liberação da partícula viral (Griffin *et al.*, 2003).

V.4) Proteína NS2

A proteína NS2 é uma proteína transmembrânica de 21 a 23 kDa, com 96 resíduos altamente hidrofóbicos, formando três ou quatro hélices transmembrânicas que se inserem na membrana do RE. A extremidade C-terminal presumivelmente reside no citoplasma permitindo a atividade autoprotease NS2/NS3 dependente de

zinco. A clivagem eficiente na junção NS2/NS3 requer os 130 aminoácidos localizados na porção C-terminal da proteína E2 e os primeiros 180 aminoácidos da NS3 localizados na porção N-terminal da proteína. Mutações sítio dirigidas revelaram que os resíduos His-92, Glu-952 e Cys-993 podem constituir o sítio ativo para a atividade proteolítica (Grakoui *et al.*, 1993; Hijikata *et al.*, 1993). A deleção da NS2 da poliproteína não aboliu a replicação do RNA em cultura de células, indicando que NS2 não é essencial para replicação do RNA (Lohmann *et al.*, 1999). De qualquer maneira, a proteína NS2 é essencial para realização completa do ciclo de replicação viral *in vitro* e *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000).

V.5) Proteína NS3/4A

A proteína NS3 apresenta dois domínios e é bifuncional. O domínio serino-protease localiza-se na região amino-terminal e o domínio helicase localiza-se na região carboxi-terminal. Com isso, a NS3 apresenta três funções enzimáticas que são; 1) atividade de protease; 2) ATPase e 3) helicase. A função protease relaciona-se a tradução da proteína precursora e as funções ATPase e helicase tem grande participação na replicação do material genético viral (Suzich, 1993; Tai, 1996). Trata-se de uma molécula essencial para o processamento da poliproteína precursora e também para a replicação viral.

V.5.1) Protease NS3/4A

A NS3 é uma proteína hidrofóbica de aproximadamente 69 kDa com a função serino-protease codificada em sua extremidade N-terminal correspondendo a um terço

da proteína. Esta região liga-se não covalentemente ao seu co-fator, a proteína NS4A que possui 54 aminoácidos, para que seja exercida sua função protease na clivagem da poliproteína. A tríade catalítica é formada pelos resíduos His57, Asp81 e Ser139 do genoma viral. A porção central da proteína NS4A é importante para o processamento eficiente das proteínas não estruturais pela NS3.

A atividade do co-fator foi mapeada a 12 aminoácidos da região central da NS4A com a extremidade N-terminal da protease NS3 (Bartenschlager *et al.*, 1994; Failla *et al.*, 1994). Experimentalmente a contribuição da NS4A para atividade protease da NS3 pode ser mimetizada por um peptídeo sintético compreendendo os resíduos 21-34 da NS4A (Tomei *et al.*, 1996). A estrutura tridimensional do domínio protease (resíduos 1-181) complexado ao co-fator NS4A sintético (resíduos 21-34) revela que o peptídeo NS4A é um componente integral da estrutura da protease NS3 (Kim *et al.*, 1996).

Comparações estruturais da proteína NS3 com e sem o co-fator, sugerem que a NS4A aumente a atividade enzimática por meio da estabilização do domínio N-terminal da protease, otimização da orientação dos resíduos da tríade catalítica e também por meio de sua contribuição na formação do sítio de ligação ao substrato na superfície da proteína (De Francesco *et al.*, 2003). Foi sugerido que a porção N-terminal da NS4A possa formar uma hélice transmembrânica que ancora o complexo NS3-4A na membrana celular (Wolk *et al.*, 2000).

A estrutura tridimensional da proteína NS3 complexada com o seu co-fator revela que esta proteína adota o dobramento encontrado nas quimiotripsinas. O complexo central consiste em dois domínios estruturais. O domínio C-terminal

(resíduos 94–181), é constituído por seis folhas β antiparalelas formando um cilindro (β Barrel), comum a todos os membros da família das quimiotripsinas, seguida por uma alfa hélice estruturalmente conservada. O domínio N-terminal (resíduos 1–93), contém oito folhas β antiparalelas em vez de seis, incluindo uma fita correspondente ao co-fator NS4A. Os resíduos do sítio ativo His57 e Asp81 localizam-se no domínio N-terminal, enquanto Ser139 está localizado no domínio C-terminal da protease. Todos os três resíduos estão situados na fissura que separa os dois domínios (Kim *et al.*, 1996) (Figura 3A).

Adicionalmente o domínio C-terminal contém o íon zinco tetraedricamente coordenado a estrutura protéica por Cys97, Cys99, Cys145 e His149 a molécula de água (Figura 3B). Um possível papel para o íon zinco pode ser induzir estabilidade no sítio ativo através da fita β D2, a qual separa o sítio ativo Ser139 e um dos ligantes do sítio do zinco Cys145. O sítio de ligação ao zinco também está localizado próximo a interface dos dois domínios da protease e pode participar na conformação desses domínios o qual contribuem para a formação do encaixe entre os aminoácidos do sítio ativo e o substrato (Kim *et al.*, 1996). Mutações de ponto nos resíduos Cys97, Cys99, Cys145 e His149 para alanina mostram que a remoção de qualquer um tem um impacto negativo na função protease (Hijikata *et al.*, 1993).

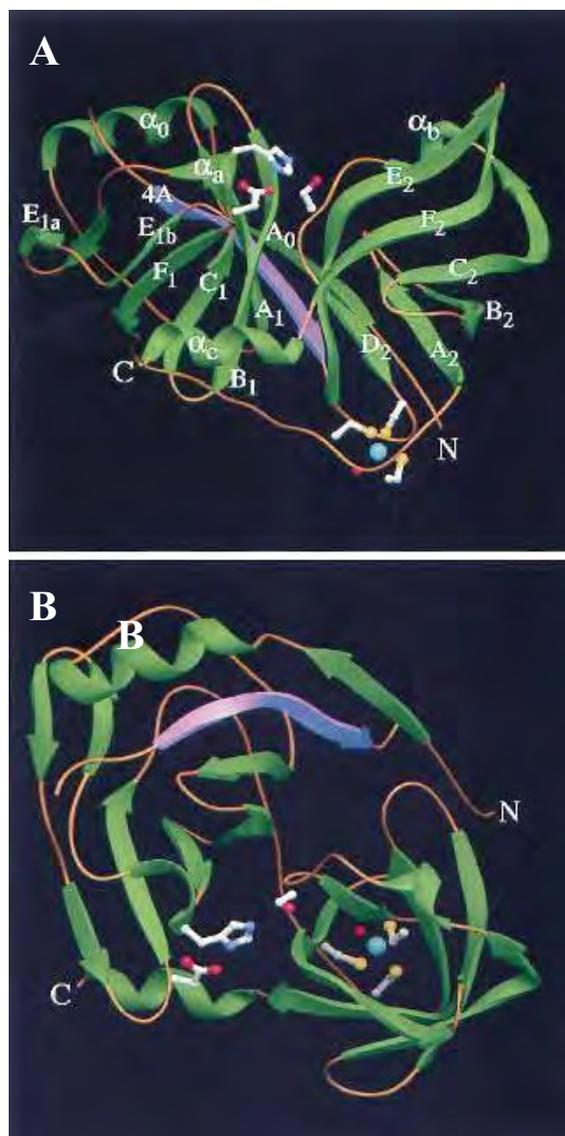


Figura 3: Complexo NS3/4A. (A) O domínio N-terminal é observado à direita e o domínio C-terminal à esquerda. Os resíduos do sítio ativo (His57, Asp81, e Ser139) são observados na fenda que separa os dois domínios. Também pode ser observado o íon Zn^{2+} (em azul) coordenado aos ligantes Cys97, Cys99, e Cys145 e a molécula de água (em vermelho). O co-fator NS4A corresponde a fita azul. (B) Visão em 90 graus do complexo NS3/4A (Modificado de Kim, *et al.*, 1996).

Tedbury e colaboradores, em 2007, confirmaram a participação do íon zinco na atividade NS2/NS3 e demonstraram que os três resíduos de cisteína (Cys97, Cys99 e

Cys145), necessários para a atividade protease da NS3, também são essenciais para a atividade de autoclivagem. O quarto resíduo do sítio do Zinco, His149 não apresentou atuação na autoclivagem. Por outro lado, o resíduo Cys922 foi identificado como um quarto aminoácido necessário à atividade da NS2/NS3, resíduo este que até o momento não se mostrou essencial para atividade protease da NS3. Isto levou os autores a proporem uma possível explanação sobre a sequência de ativação dessas duas proteases. Este modelo prediz que quando o zinco está coordenado ao resíduo Cys922, juntamente com Cys97, Cys99 e Cys145, o precursor está competente para a NS2/NS3 autoclivagem. Quando o quarto resíduo coordenado for a His149, o precursor assume a atividade protease da NS3.

A protease NS3/4A não é apenas essencial para geração das proteínas virais, mas ela também pode suprimir a resposta imune antiviral do hospedeiro clivando possíveis alvos celulares envolvidos na indução dos Interferons tipo-1, como o Interferon alfa e o Interferon beta (Foy *et al.*, 2003).

A indução do IFN é regulada pelos fatores de transcrição NFκ-B e fator 3 de regulação do IFN (IRF3), o que são ativados por uma cascata de sinalização iniciada a partir da geração de RNAs (RNA dupla fita) durante a replicação do RNA viral na célula hospedeira (McWhirter *et al.*, 2005). O receptor para o RNAs viral intracelular foi identificado recentemente como RIG-I (*retinoic acid-induced gene 1*), o qual contém um domínio RNA helicase que se liga ao RNAs (Seth *et al.*, 2005). RIG-I também contém um domínio em tandem de recrutamento de caspases N-terminal (CARDs) que interage com a proteína MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*), também conhecida como IPS-1, VISA, e CARDIF (Seth *et al.*, 2005; Kawai *et al.*,

2005). Estudos recentes mostram que a NS3/4A inibe a indução do IFN por meio do RIG-1; mas RIG-1 não é clivado pela NS3/4A (Breiman *et al.*, 2005; Foy *et al.*, 2005). MAVS contém um domínio transmembrânico C-terminal que mantém a proteína ancorada à membrana da mitocôndria (Seth *et al.*, 2005). Esta localização é essencial para sua função, pois sua remoção impede a indução do IFN.

A NS3/4A também foi encontrada clivando TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing IFN-beta*) (Li *et al.*, 2005), uma proteína adaptadora que se liga aos receptores TLR3 e TLR4 (*toll-like receptors*) (Akira *et al.*, 2003). De qualquer modo, TRIF não é essencial para indução do IFN pelos vírus (Kato *et al.*, 2001).

Li e colaboradores em 2005, evidenciaram que a proteína MAVS é o alvo proteolítico da NS3/4A. Neste estudo foi observado que a NS3/4A cliva a MAVS na C508, resultando no deslocamento do fragmento N-terminal da MAVS da mitocôndria ocasionando a supressão da indução de IFN-beta. Uma mutação de ponto na Cys508 previne a clivagem da MAVS pela NS3/4A e restabelece a indução do IFN-beta em replicons de HCV, sugerindo que a clivagem da MAVS seja responsável pela supressão da indução do IFN em células replicativas de HCV. Também foi evidenciado que a NS3/4A liga-se e co-localiza-se com a MAVS na mitocôndria.

A atividade da protease NS3/4A é um alvo ideal para a terapia antiviral pois com a sua inibição espera-se bloquear a replicação viral, diretamente pela supressão da produção da poliproteína e indiretamente por restaurar a resposta imunológica do hospedeiro através da via do IFN (Franco *et al.*, 2008). A clivagem da proteína MAVS pela NS3/4A pode limitar a eficiência de terapias baseadas em IFN, sugerindo que a inibição da protease pode aumentar a ação do IFN (Franco *et al.*, 2008).

Em adição à função protease, estudos prévios indicam que o domínio N-terminal da NS3 tem o potencial de transformação celular (Sakamuro *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000; Zemel *et al.*, 2001). A inoculação subcutânea em camundongos com células previamente transfectadas com um plasmídeo que expressa a porção N-terminal da proteína NS3 foi capaz de induzir a transformação tumoral (He *et al.*, 2003). Os mecanismos envolvidos na transformação celular não são completamente conhecidos. Contudo, a habilidade em transformar da protease foi abolida quando as células foram tratadas com os inibidores indicando que a atividade protease é requerida para a atividade de transformação da protease NS3 (Zemel *et al.*, 2001).

Em virtude do tratamento atualmente disponível para a Hepatite C não apresentar resultados para 40% a 50% dos pacientes do genótipo 1 e para 30% dos pacientes com genótipo 2 ou 3 (Heathcote *et al.*, 2004) e também apresentar efeitos colaterais pouco toleráveis, há a necessidade imediata de se buscar novas drogas anti-HCV mais efetivas e com poucos efeitos colaterais.

A serino-protease NS3/4A e a RNA polimerase RNA dependente NS5B são consideradas os alvos mais atrativos para o desenvolvimento de drogas anti-virais. O sucesso com os inibidores de protease do vírus HIV sugere que proteases virais assim como a NS3/4A do vírus HCV podem ser um excelente alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Contudo, os esforços para encontrar potentes candidatos a drogas que sejam moléculas oralmente disponíveis foram dificultadas pela natureza superficial do sulco no qual o substrato se liga a NS3/4A. Todavia, progressos significantes foram feitos recentemente para identificar potentes inibidores contra a protease do HCV.

V.5.2) Inibidores para a protease NS3/4A

O composto BILN 2061 (*Ciluprevir; Boehringer Ingelheim*), um peptídeo macrocíclico mimético, foi o primeiro inibidor da protease do HCV a participar de ensaios clínicos (Lamarre *et al.*, 2003). O BILN 2061 foi desenvolvido a partir da constatação de que o ácido carboxílico carbóxi-terminal de hexapeptídeos fornece uma afinidade que garante a seletividade desejada para a enzima do HCV sobre as proteases celulares (Llinas-Brunet *et al.*, 2000). Foi observado que a protease NS3/4A é inibida por produtos da clivagem N-terminal de peptídeos substratos (Llinàs-Brunet *et al.*, 1998).

Quando o BILN 2061 foi administrado a pacientes infectados pelo HCV do genótipo 1, duas vezes ao dia por somente dois dias, induziu a um declínio rápido, dose-dependente da carga viral (Lamarre *et al.*, 2003; Hinrichsen *et al.*, 2004). O tratamento com BILN 2061 foi menos efetivo para os genótipos virais 2 e 3, embora tenha sido observado uma diminuição clinicamente significativa nos títulos virais em vários pacientes (Reiser *et al.*, 2005). Apesar do efeito do BILN 2061 ser transiente, espera-se que tratamentos prolongados com inibidores da protease viral possam atingir altos índices de resposta virológica sustentada em especial, nos pacientes que não respondem ao tratamento com interferon. Infelizmente o desenvolvimento clínico do BILN 2061 foi interrompido devido a observação da ocorrência de toxicidade cardíaca em animais de laboratório (Reiser *et al.*, 2005). No entanto, a toxicidade pode não ser a única preocupação. A resistência ao BILN 2061 foi observada em sistemas de replicons (Lu *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004). Uma única mutação já pode ser suficiente para conferir

resistência ao BILN 2061 *in vitro*, predizendo que mutantes capazes de escapar do sistema imune podem surgir com alta frequência em indivíduos infectados com HCV. Substituições nos aminoácidos arginina 155, alanina 156 ou ácido aspártico 168 no domínio protease induzem a um alto grau de resistência ao BILN 2061 (Trozzi *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004). Curiosamente, a substituição do ácido aspártico por glutamina na posição 168 é naturalmente encontrada na protease do HCV genótipo 3, possivelmente explicando a atividade reduzida do composto BILN 2061 em pacientes infectados com vírus do tipo 3 (Thibeault *et al.*, 2004).

O VX-950 (*Telaprevir* - *Vertex/Mitsubishi*) é um composto peptídeomimético inibidor da protease NS3/4A o qual estabiliza-se dentro do sítio ativo da enzima por meio da inclusão de um agrupamento alfa-cetoamido (*Vertex Pharmaceuticals Reports*). O alfa-cetoamido funciona como uma âncora para o sítio ativo da enzima sendo capaz de ligar-se a ele por meio de uma ligação covalente reversível (Figura 4).

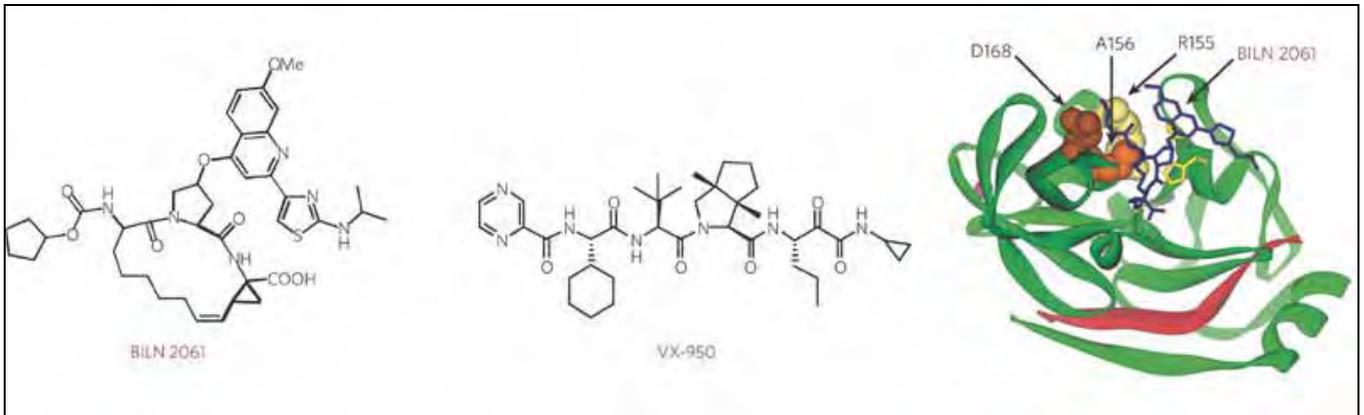


Figura 4: Estrutura dos inibidores BILN2061 e VX-950 (à esquerda) e da protease NS3 (à direita) (verde) complexada ao seu co-fator NS4A (vermelho). Os resíduos que constituem o sítio catalítico são demonstrados em amarelo. O átomo zinco é indicado em púrpura. O BILN2061 pode ser visualizado complexado ao sítio ativo (azul). Os resíduos que constituem resistência a BILN2061 e VX-950 (D168, A156 e R155) também são observados (De Francesco, *et al.*, 2005).

O composto inibidor não só impede eficientemente a replicação do HCV em cultura de células como também é suficientemente tolerado em animais de laboratório para instruir o seu avanço em ensaios clínicos. Resultados preliminares dos ensaios clínicos nas fases Ia/Ib indicam que o VX-950 foi bem tolerado e demonstrou atividade antiviral (*Vertex Pharmaceuticals Reports*). O tratamento com VX-950 induziu a um declínio rápido da carga viral em pacientes infectados pelo HCV do genótipo-1, com uma redução média no RNA viral variando entre 2 e 4,4 log₁₀ ao final de duas semanas de terapia. Embora este tratamento relativamente curto não tenha sido suficiente para erradicar a doença e a viremia tenha retornado aos valores iniciais após o término da terapia, estes resultados estimularam o planejamento de estudos clínicos adicionais.

O VX-950 interage covalentemente com a protease mas isto não o torna imune ao desenvolvimento de resistência viral (Lin *et al.*, 2004). Há somente resistência cruzada parcial entre BILN 2061 e VX-950, possivelmente refletindo as diferenças na interação dos inibidores com a enzima. Substituições do ácido aspártico na posição 168 da NS3 confere resistência ao BILN 2061 mas não ao VX-950. Inversamente, a substituição da alanina na posição 156 produz resultados diferentes dependendo da natureza da mutação. Deste modo, a substituição da alanina por serina na posição 156 confere resistência seletiva ao VX-950 (Lin *et al.*, 2004), enquanto a substituição do mesmo resíduo por treonina ou valina confere significativa resistência cruzada ao VX-950 e BILN 2061 assim como a outros inibidores estruturalmente diferentes (Lin *et al.* 2004).

Vários outros inibidores peptídeomiméticos da protease NS3/4A apresentam-se em vários estágios de desenvolvimento. Contudo, desde que a resistência cruzada a diversos inibidores de protease tenha sido observada em decorrência da mutação de um único aminoácido, a combinação de múltiplos inibidores de protease poderá ter valor limitado na prática clínica.

V.5.3) *Helicase NS3*

A porção C-terminal da proteína não estrutural NS3 corresponde ao domínio helicase o qual possui atividades NTPase (*RNA-stimulated nucleoside triphosphatase*) e RNA helicase. A atividade helicase é indispensável para replicação viral *in vivo*, presumivelmente por linearizar a fita de RNA durante o processo de replicação permitindo a sua amplificação e, conseqüentemente, a síntese da poliproteína precursora viral.

A primeira estrutura cristalizada da helicase do vírus HCV foi resolvida apenas alguns anos após a sua purificação (Yao *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1999; Mackintosh *et al.*, 2006). A porção helicase da NS3 é constituída por três domínios. Quando vista como um molécula em forma de Y o domínio 1 N-terminal e o domínio 2 ficam acima do domínio 3 C-terminal (Figura 5). Em duas das estruturas descritas (Kim *et al.*, 1998; Mackintosh *et al.*, 2006), aparecem oligonucleotídeos ligados a helicase na fissura que separa o domínio 3 dos domínios 1 e 2 (Figura 6). Em muitas estruturas, uma molécula de sulfato é vista ligada entre os domínios 1 e 2, em uma posição onde o ATP foi visualizado, sob alta resolução, em estruturas de helicases similares (Soultanas *et al.*, 1999; Velankar *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2003). Quando o complexo formado pela NS3-NS4A é visto com os sítios de ligação ao zinco e ao ATP a frente da molécula, a protease fica na parte de trás, com o seu sítio ativo enterrado atrás dos domínio da helicase (Yao *et al.*, 1999). Anteriormente à protease está o seu co-fator NS4A, o qual posiciona a tríade catalítica para ação da protease . O íon zinco localiza-se no mesmo lado da protease, como o co-fator NS4A (Kim *et al.*, 1996) (Figura 7).

A principal diferença entre as estruturas de HCV disponíveis (Yao *et al.*, 1997), (Kim *et al.*, 1998), (Cho *et al.*, 1998), (Yao *et al.*, 1999) e (Mackintosh *et al.*, 2006; no qual descreveu a estrutura da helicase como sendo um dímero ligado a um único oligonucleotídeo), diz respeito à posição do domínio 2 em relação aos domínios 1 e 3. Os domínios 1 e 3 compartilham mais de uma interface do que o domínio 2 compartilha com cada um dos outros domínios.

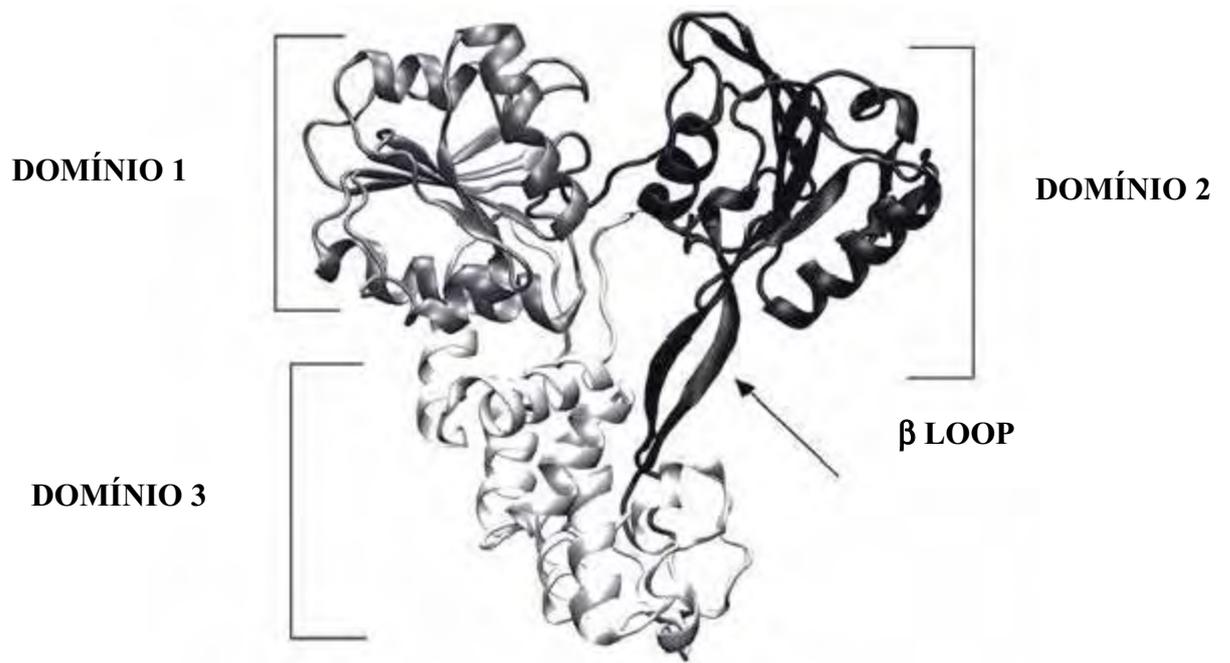
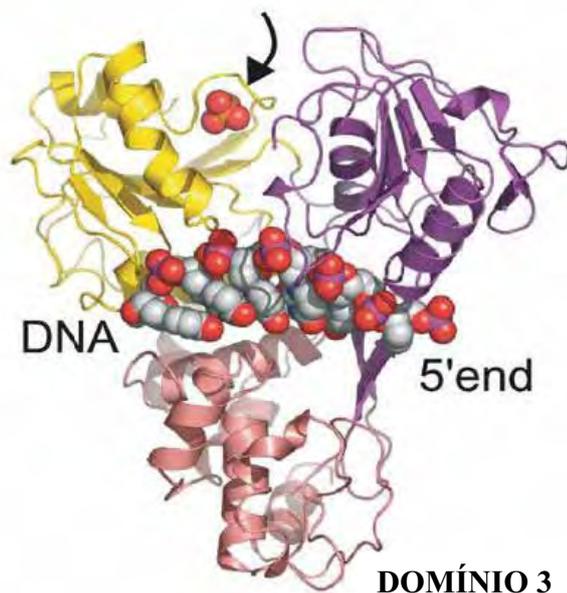


Figura 5: Diagrama dos três domínios da helicase do HCV (PDB 1A1V – Kim et al., 1998) (Modificado de Gozdek *et al.*, 2008).

SÍTIO DE LIGAÇÃO AO ATP

DOMÍNIO 1



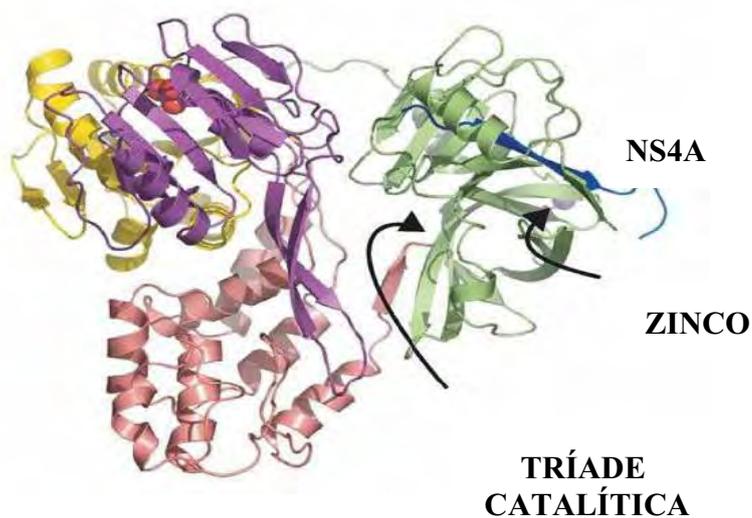
DOMÍNIO 2

DNA

5'end

DOMÍNIO 3

Figura 6: Estrutura da helicase complexada a uma molécula de DNA e ao íon sulfato que ocupa o sítio de ligação ao ATP (Kim *et al.*, 1998). O domínio N-terminal (domínio 1) está mostrado em amarelo, O domínio C-terminal (domínio 2) pode ser visualizado em púrpura e o domínio 3 em pink (Modificado de Frick, 2007)



NS4A

ZINCO

TRÍADE
CATALÍTICA

Figura 7: Complexo NS3/4A com a porção central da NS4A covalentemente ligada a extremidade N-terminal da NS3 (Howe *et al.*, 1999) (PDB 1CU1 – Yao *et al.*, 1999). Os três domínios da helicase são evidenciados em amarelo (domínio 1), púrpura (domínio 2) e pink

(domínio 3). A protease pode ser visualizada em verde e o co-fator NS4A em azul (Modificado de Frick, 2007).

O domínio 2 conecta-se aos domínios 1 e 3 *via* conectores flexíveis, o qual permite a ele rotacionar-se livremente em relação aos domínios 1 e 3. Em algumas estruturas o domínio 2 gira afastado do domínio 1 adquirindo uma conformação aberta, enquanto em outras estruturas o domínio 2 fica mais próximo ao domínio 1 adquirindo uma conformação fechada (Figura 8).

O ponto central dessas rotações é dado por contatos adicionais entre o domínio 3 e uma fita β originada do domínio 2 (Echols *et al.*, 2003). Não está claro a causa destas variações estruturais, mas podem ser consequência da variação natural que ocorre na sequência de aminoácidos da proteína NS3.

Os genótipos conhecidos do vírus HCV apresentam diferenças na sequência nucleotídica e as substituições de aminoácidos correspondentes podem afetar a estrutura da proteína.

A sequência de aminoácidos da helicase dos três genótipos do vírus HCV, foi examinada anatomicamente. Yao e colaboradores, em 1997, e Kim e colaboradores, em 1998, examinaram uma enzima isolada do mesmo genótipo 1a. Cho e colaboradores em 1998, examinaram a helicase do genótipo 1b cepa BK e Yao e colaboradores, em 1999, usaram uma enzima de outra cepa do genótipo 1b. Embora haja muitas diferenças entre as estruturas, nenhuma delas parece ser genótipo-específicas; as estruturas do genótipo 1a são diferentes umas das outras assim como são diferentes das estruturas do genótipo 1b.

Lam e colaboradores em 2003a, avaliaram o impacto da variação genotípica nas várias atividades da helicase do HCV examinando proteínas

recombinantes que foram isoladas de clones infecciosos de HCV do genótipo 1a (Yanagi *et al.*, 1997), 1b (Yanagi *et al.*, 1998), e 2a (Yanagi *et al.*, 1999). Embora tenham sido observadas algumas diferenças entre os genótipos, as proteínas são surpreendentemente similares. A principal diferença entre as cepas dos genótipos 1 e 2 pode ser atribuída a variação no resíduo 450, que normalmente é uma Treonina (Thr), mas no clone infeccioso do genótipo é uma Isoleucina (Ile) (Yanagi *et al.*, 1999).

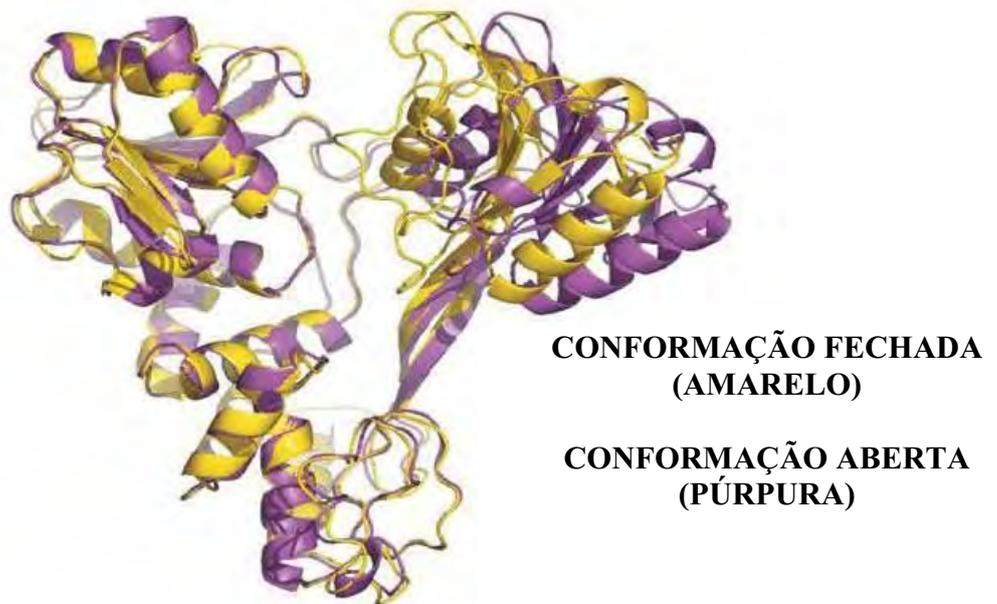


Figura 8: Comparação das conformações fechada (PDB 1HEI – Yao *et al.*, 1997) e aberta (PDB – 8OHM – Cho *et al.*, 1998).

Experimentalmente, quando o aminoácido treonina 450 é trocado por Isoleucina, a proteína liga-se diferentemente ao DNA fita simples e também desenovela o DNA mais rapidamente, sugerindo que a interação do Thr450 com o

DNA (modelo experimental) observado na estrutura cristalizada, de algum modo modula o movimento a ação da helicase (Yanagi *et al.*, 1999).

Uma sequência consenso codificadora da helicase do HCV revela que há numerosas extensões dos aminoácidos que não variam nos isolados conhecidos. As sequências dos motivos numeradas são compartilhadas com helicases relacionadas (Gorbalenya and Koonin, 1998; Hall and Matson, 1999). Alguns desses motivos, como a porção *DExC/H-box* dos motivos II e IV são característicos somente das helicases estreitamente relacionadas a helicase do HCV, enquanto outros, como o motivo Walker A (motivo I), são conservados entre todas as helicases e também entre uma grande variedade de outras proteínas que hidrolizam o ATP. Outros motivos são encontrados somente em HCV e vírus relacionados incluindo, o *Arg-clamp* (Arg393), o *Phe loop* (Lam *et al.*, 2003(b), e todos os motivos no domínio 3.

Os motivos I, Ia, II, III, IV, V, e VI, que são conservados em helicases similares codificadas por outros vírus e organismos celulares, alinham-se na fissura de ligação ao ATP. Alguns desses motivos projetam resíduos para dentro do sítio de ligação ao ácido nucléico. Estes sete motivos da helicase formam o motor que converte a energia química derivada da hidrólise do ATP em uma força química que guia o seu movimento levando à ruptura dos pares de bases do DNA ou RNA (Frick, 2007).

A atuação da maioria dos resíduos conservados nos motivos I a VI são investigados usando mutações sítios dirigidas (Tai *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Frick *et al.*, 2004). Mutações nos motivos I a VI normalmente causam impacto na

habilidade da proteína em linearizar o material genético assim como na hidrólise do ATP, mostrando que estas duas atividades agem conjuntamente.

Além dos motivos I a VI, os domínios 1 e 2 da helicase apresentam tanto regiões variáveis quanto conservadas. Frick e colaboradores, em 2004, com o objetivo de descobrir as regiões para ligação de possíveis inibidores, examinaram o papel de dois motivos no domínio 2 que são conservados em todos os isolados de HCV mas não em proteínas relacionadas. A razão para isso é que compostos que se liguem a estes sítios podem não ser tóxicos já que sítios similares não estão presentes em helicases celulares relacionadas. Com isso, o primeiro motivo identificado concentra-se na Arg393, um resíduo que entra em contato com a estrutura central do ácido nucléico. Quando Arg393 é trocado por Alanina, a proteína ainda realiza a hidrólise do ATP, estimulada pelo RNA viral, mas perde a atividade helicase. Com esta substituição a helicase também liga-se mais fracamente ao RNA tanto na presença quanto ausência do ATP não-hidrolisado, sugerindo que este motivo *Arg-clamp* funcione como um elo que conecta a proteína ao ácido nucléico por meio do qual ocorre o seu deslocamento (Lam *et al.*, 2003(b)).

O segundo motivo exclusivo da helicase do HCV, forma um *loop* que conecta duas folhas- β que se estendem do domínio 2. Esta estrutura é composta pelos aminoácidos Thr430 ao Ala452, e também pelo par de resíduos, Phe438 e Phe444 e está localizada em uma região altamente conservada da extremidade do *loop*. O giro do *loop* é composto dos aminoácidos Phe438 a Phe444 e até o momento sua função têm sido motivo de pesquisas. Kim e colaboradores em

1998, propuseram que este *loop* funcione como uma região de ligação ao RNA simples fita em proteínas. Alternativamente, Yao e colaboradores em 1997, propuseram que Phe438 e Phe444 podem empacotar-se em uma região hidrofóbica juntamente com Phe531, Phe536, e Trp532, permitindo que o *loop* tenha um papel mais estrutural. Mutações em outros resíduos fenilalanina que flanqueiam Phe438 e Phe444, demonstram que esse *loop* não está envolvido na ligação ao ácido nucléico. Mais propriamente, Phe438 e Phe444 são importantes tanto para a manutenção da estrutura final da proteína quanto para a modulação das alterações conformacionais que levam a liberação do material genético mediante a ligação do ATP (Lam *et al.*, 2003(b)).

V.5.4) Inibidores para a helicase NS3

Muitos compostos que inibem a helicase do vírus HCV foram reportados, contudo, há muitos obstáculos que precisam ser superados para que estes inibidores se tornem agentes anti-virais viáveis. O principal problema parece ser a toxicidade já que a matriz dos domínios da helicase do HCV são conservados em uma grande variedade de proteínas celulares. Conseqüentemente, o principal foco está em encontrar inibidores que se liguem em sítios que não são conservados nas enzimas celulares, como o sítio de ligação ao RNA. Mas, mesmo que estes inibidores nunca se tornem drogas antivirais, eles podem ser úteis na elucidação do papel da helicase no ciclo do vírus.

V.5.4.1) Inibidores baseados em ácidos nucléicos

Com o objetivo de desenvolver inibidores para o HCV, as pesquisas concentram-se atualmente no desenvolvimento de aptâmeros de RNA para a helicase do vírus HCV.

Aptâmeros são pequenos oligonucleotídeos de cadeia simples, que têm sido desenvolvidos nos últimos 15 anos para diversos alvos e com várias aplicações. Estas incluem a inibição de receptores e enzimas, para a identificação de pequenas moléculas "sensoras" e o desenvolvimento de alvos terapêuticos para diagnóstico e imagem. Além disso, aptâmeros também foram desenvolvidos para alvos que incluem diferentes doenças, tais como HIV, doenças tropicais, câncer e inflamação.

Os aptâmeros podem ser compostos de RNA, DNA ou bases modificadas, e são selecionados a partir de uma população de sequências aleatórias por meio de uma tecnologia conhecida por SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential amplification*). Neste procedimento, uma biblioteca de RNA é rastreada por sequências que se ligam a macromolécula de interesse a qual se deseja inibir a função. Somente aquelas sequências que se ligarem firmemente são amplificadas para criar uma nova biblioteca, e o processo de seleção é repetido com a nova biblioteca. As sequências selecionadas possuem a habilidade de reconhecer ligantes específicos formando regiões de ligação e podem ligar-se a ácidos nucleicos (Le Tinevez *et al.*, 1998; Pileur *et al.*, 2003), proteínas (Bock *et al.*, 1992; Lupold *et al.*, 2002) ou pequenos compostos orgânicos (Berens *et al.*, 2001; Burgstaller *et al.*, 1995). Uma vez identificados, os aptâmeros podem ser sintetizados por métodos automáticos.

Durante a sua síntese os aptâmeros também podem sofrer modificações para torná-los mais estáveis ou para direcioná-los diretamente às células infectadas por meio da terapia gênica. Isto ocorre porque o RNA possui uma alta instabilidade celular o que pode dificultar sua utilização como droga antiviral (Brody and Gold, 2000; Eaton *et al.*, 1997; Gewirtz, 1999).

Um conjunto de aptâmeros específicos para helicase do HCV foi gerado modificando aptâmeros que se ligam firmemente e inibem a serino-protease NS3-NS4A. Eles compartilham a sequência conservada GA(A/U)UGGGAC (Fukuda *et al.*, 2000), ligada a protease mil vezes mais que outras sequências de RNA randômicas efetivas na inibição da protease NS3 (Fukuda *et al.*, 2000; Nishikawa

et al., 2003). Quando os aminoácidos Arg130, Arg161, e Lys165 da proteína NS3 são substituídos por alanina, os aptâmeros já não se ligam a NS3 sugerindo que eles agem próximos a estes resíduos os quais estão localizados na região de ligação entre os domínios protease e helicase (Hwang *et al.*, 2000). Para criar um aptâmero que iniba as atividades protease e helicase da NS3, uma cauda com 14 uridinas (Uracila ligada a um anel de ribose) foi adicionada a um dos aptâmeros mais efetivos na inibição da protease, e o resultado produzido foi um novo aptâmero que interage com ambos os domínios protease e helicase (Fukuda *et al.*, 2004). O mesmo grupo de pesquisadores reportou um novo composto (*advanced dual functional*) no qual um outro aptâmero, selecionado para ligação à helicase (Nishikawa *et al.*, 2004), é amarrado a um aptâmero para ligação à protease usando um *poly(U) linker*. Este novo aptâmero é aproximadamente cinco vezes mais efetivo que cada um deles quando não estão covalentemente ligados (Umehara *et al.*, 2005).

Um outro grupo também selecionou aptâmeros para porção helicase da proteína NS3 usando o procedimento SELEX (Hwang *et al.*, 2000). Este aptâmero, chamado SE RNA dobra-se para formar quatro voltas com os pares de bases CG que são semelhantes as voltas localizadas na extremidade 3' da fita negativa do RNA do HCV. Esta observação sugere que os aptâmeros SE RNA podem ligar-se a helicase de uma maneira similar às voltas localizadas na extremidade 3' da fita negativa do RNA viral (Banerjee and Dasgupta, 2001). Quando utilizado em cultura de células Huh 7 (hepatócitos humanos) infectada com replicons de HCV, os aptâmeros SE RNA atrasaram a síntese do RNA viral,

e interessante quando marcados, também podem ser usados como uma ferramenta de diagnóstico para detectar a proteína NS3 em células de pacientes infectados (Nishikawa *et al.*, 2004).

V.5.4.2) Anticorpos

O terceiro, e, possivelmente, o mais ambicioso método atualmente explorado para inibir a helicase do HCV é gerar moléculas similares aos anticorpos (*antibody-like*) que, quando expressas intracelularmente ligam-se e inibem as atividades da helicase. Quase todos os pacientes infectados com o vírus produzem anticorpos diretamente contra a proteína NS3, e a vasta maioria deles liga-se a porção helicase (Chen *et al.*, 1998). Vários grupos estão trabalhando na introdução de anticorpos recombinantes nas células para uma “imunização celular”, um procedimento que foi usado experimentalmente com HIV (Goncalves *et al.*, 2002). Nesta metodologia, células infectadas com HCV são transfectadas com um gene expressando uma porção de um anticorpo selecionado para reagir com NS3. Um método é usar anticorpos com fragmentos de cadeia simples (*single chain fragment – ScFv*). Um *ScFv* é composto por um domínio variável de uma imunoglobulina de cadeia pesada conectada por um polipeptídeo a uma região de cadeia leve. Cada molécula pode ser construída usando PCR. O outro método usa um fragmento de anticorpo (*Antibody fragment - Fab*) que contém a cadeia leve completa e os variáveis e primeiros domínios constantes da cadeia pesada. Uma construção do tipo *Fab* é maior e usualmente mais estável que uma construção do tipo *ScFv*.

Para construir uma molécula *ScFv*, primeiramente um PCR imunoglobulina-específico é usado para construir uma biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos a partir de células do plasma de pacientes infectados. Para identificar quais anticorpos reagem com a helicase do HCV os fragmentos são fusionados a capa protéica do bacteriófago, e os fagos com uma alta afinidade pela helicase do HCV são, então, purificados (tecnologia conhecida como *Phage Display*). Tessman e colaboradores em 2002, usaram esta técnica para isolar uma série de *ScFv*'s com alta afinidade e especificidade a helicase do HCV. Outros *ScFv*'s com o mesmo objetivo e finalidade, foram construídos por *splicing* junto com domínios variáveis de anticorpos monoclonais (Sullivan *et al.*, 2002), e após expressão e purificação, várias dessas proteínas recombinantes inibiram as funções da helicase (Sullivan *et al.*, 2002; Artsaenko *et al.*, 2003).

Um *ScFv* em particular consiste de regiões variáveis do anticorpo monoclonal humano CM3.B6, o qual reconhece um epítipo presente nos motivos IV e V da helicase (Mondelli *et al.*, 1994). O *ScFv* CM3.B6 foi expresso em hepatócitos infectados com HCV (células HepG2), e reações de *immunoblots* revelaram uma interação intracelular entre o anticorpo e a NS3. A síntese do RNA viral em células contendo um vetor carregando o *ScFv* CM3.B6, foi reduzida em 10 vezes (Sullivan *et al.*, 2002).

A purificação utilizando bacteriófagos (*Phage Display*) também foi usada para isolar um *Fab* (*Antibody fragment*) anti-HCV de um paciente infectado com HCV do genótipo 1. Prabhu e colaboradores, em 2004, isolaram o Hfab-aNS3 demonstrando sua atividade anti-viral (Prabhu *et al.*, 2004). Hfab-aNS3

reconheceu um epítopo presente nos motivos I a V da proteína, e quando purificado e pré-incubado com a helicase, foi capaz de abolir a atividade de desenovelamento do material genético exercida pela helicase. A expressão intracelular do fragmento de anticorpo HFab-aNS3 em replicons de HCV transfectados em células Huh-7 (hepatócitos humanos) suprimiu a expressão da proteína NS3 assim como inibiu a síntese do RNA viral.

V.6) Proteína NS4B

NS4B é uma proteína integral de membrana de 27 kDa, a qual foi predito conter pelo menos quatro domínios transmembrânicos e uma hélice anfipática N-terminal que é a responsável pela associação à membrana do RE (Lundin *et al.*, 2003). A proteína NS4B tem a habilidade de induzir a formação de um compartimento especializado na membrana, conhecido como *membranous web* onde a replicação ocorre (Egger *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004).

V.7) Proteína NS5A

NS5A é uma fosfoproteína ancorada na membrana que pode ser encontrada sob as formas fosforilada (56 kDa) e hiperfosforilada (58 kDa). Baseado em estudos de comparação de sequências e proteólise da proteína purificada, NS5A foi dividida em três domínios: domínio 1 (aa 1-213), domínio 2 (aa 250-342) e domínio 3 (aa356-447) (Tellinghuisen *et al.*, 2004).

Foi evidenciado recentemente que uma alfa hélice anfipática localizada na porção N-terminal é a responsável pela sua ligação à membrana do RE (Brass *et al.*,

2002). Sua estrutura 3D foi determinada recentemente (Penin *et al.*, 2004) e apresenta resíduos polares conservados na superfície da membrana, o qual define provavelmente uma única região envolvida em interações específicas proteína-proteína essenciais para a formação de um complexo funcional de replicação para o HCV. Um estudo estrutural demonstrou que o domínio 1 segue imediatamente a alfa hélice ancorada na membrana e forma uma estrutura dimérica com um motivo coordenado ao zinco (Tellinghuisen *et al.*, 2005).

V.8) Proteína NS5B

A NS5B é uma proteína de 68 kDa que contém uma seqüência conservada que caracteriza uma RNA-polimerase RNA dependente (RdRp), incluindo o motivo Gdd que produz atividade catalítica. Esta proteína possui uma cauda ancorada na membrana do RE e sua região C-terminal contendo 21 aminoácidos forma um domínio transmembrânico alfa hélice, que é dispensável para a atividade polimerase *in vitro* mas é responsável por direcionar a proteína, após a tradução, para o lado citoplasmático do RE (Moradpour *et al.*, 2004). Análise da estrutura em cristal da NS5B revela que a proteína assemelha-se a uma mão direita contendo palma, dedos e subdomínios no polegar, similar a outras polimerases (Lesburg *et al.*, 1999; Bressanelli *et al.*, 2002). Ao contrário de outras polimerases que possuem estruturas mais abertas, como a do vírus HIV-1, a RdRP do HCV tem o seu sítio ativo fechado, resultando em uma proteína com uma conformação fechada (Butcher *et al.*, 2001).

VI) O ciclo replicativo

O vírus HCV segue uma estratégia de replicação similar a outros vírus de RNA de polaridade positiva (Figura 9).

A entrada do vírus na célula hospedeira é possivelmente mediada por receptores de superfície celular que interagem com as glicoproteínas E1 e E2 do envelope viral (Lindenbach *et al.*, 2006). Acredita-se que E1 seja a responsável pela fusão das membranas e E2 liga-se aos receptores celulares, mas não está claro se a fusão ocorre em E1 ou E2 (Lavie *et al.*, 2007).

Candidatos a receptores incluem o CD81 (*E2-binding tetraspannin*) (Pileri *et al.*, 1998; Meola *et al.*, 2000; Cormier *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2006), SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) (Scarselli *et al.*, 2002; Voisset *et al.*, 2005), LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) (Monazahian *et al.*, 1999), CLAUDINA-1,6 e 9 (Evans, *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007; Mee *et al.*, 2008), DC-SIGN (*dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non integrin*) (Pohlmann *et al.*, 2003; van Kooyk *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2005) e L-SIGN (*liver/lymph node specific intercellular molecule 3 grabbing integrin*) (Cormier *et al.*, 2004; Lozach *et al.*, 2004).

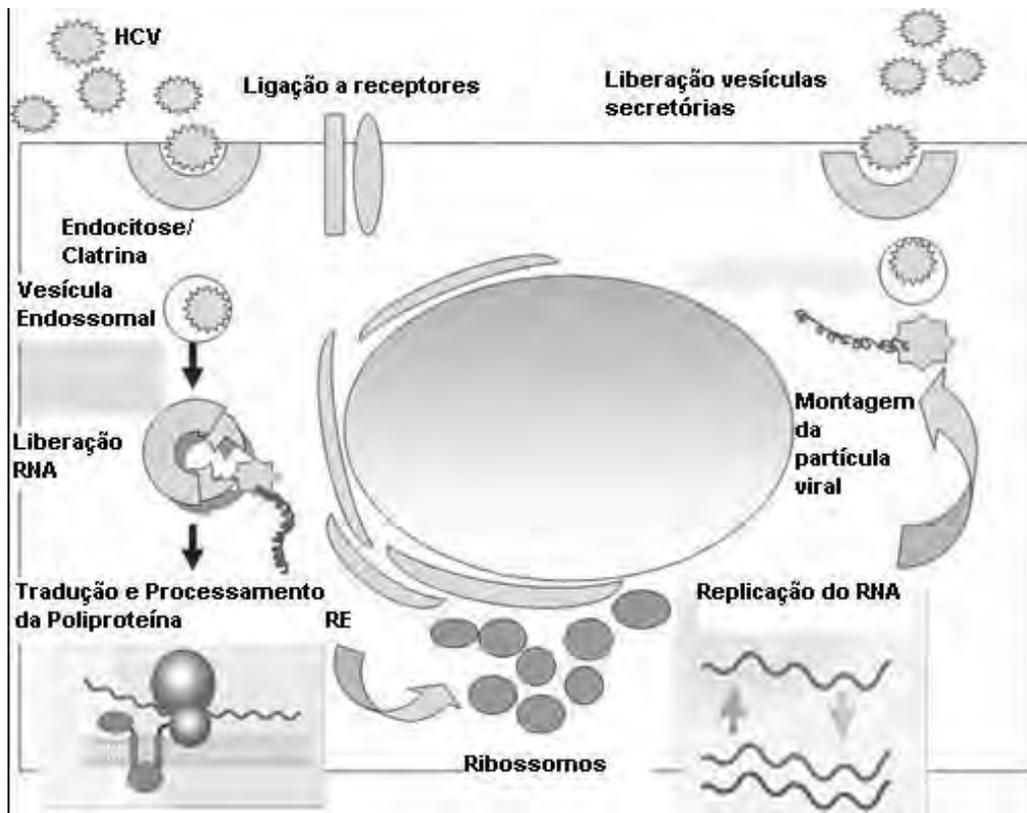


Figura 9: Ciclo replicativo do vírus HCV nos hepatócitos. Cada passo representa um sítio potencial para intervenção terapêutica (Modificado de Cholongitas *et al.*, 2008).

O papel do receptor CD81 na entrada do HCV na célula hospedeira, tem sido minuciosamente caracterizado e documentado (Bartosch *et al.*, 2003; Cormier *et al.*, 2004; Heo *et al.*, 2006). CD81 é uma proteína de membrana não glicosilada caracterizada por quatro domínios transmembrânicos e duas alças extracelulares, uma pequena (SEL) e uma grande (LEL) (Levy *et al.*, 1998; Drummer *et al.*, 2005). LEL foi identificada como sendo a região de ligação a glicoproteína viral E2, e aminoácidos críticos para manutenção desta interação já foram descritos (Higginbottom *et al.*, 2000; Petracca *et al.*, 2000). Por outro lado, enquanto em CD81 já foram identificadas

possíveis regiões de ligação a E2, o mesmo não ocorre para E2, no qual ainda não se conhece precisamente a região da glicoproteína que interage com o receptor CD81. A primeira região proposta compreende os aminoácidos 474 ao 492, a segunda região identificada espalha-se da posição 522 a 551 (Roccasecca *et al.*, 2003; Flint *et al.*, 2006) e a terceira região fica entre os aminoácidos 612 e 619 (Yagnik *et al.*, 2000; Roccasecca *et al.*, 2003).

Nos pacientes infectados pelo HCV as partículas virais podem apresentar-se associadas as lipoproteínas do tipo LDL (*low density lipoproteins*) e do tipo VLDL (*very low density lipoproteins*). Assim pode ser reconhecidas tanto pelos receptores do tipo LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) quanto pelos receptores do tipo SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) que se liga a várias lipoproteínas, incluindo HDL, LDL e VLDL. O SR-BI caracteriza-se por ser uma proteína cuja expressão ocorre no fígado e sua função é facilitar a absorção de lipídeos (Rigotti *et al.*, 2003; Kapadia *et al.*, 2007).

As claudinas constituem uma família de proteínas integrais de membrana envolvidas na formação de junções compactas, que são responsáveis pela formação e manutenção da barreira epidermal entre as células. Por análise mutacional Zheng e colaboradores (2007) evidenciaram que os aminoácidos N38 e V45 da proteína claudina-9 são importantes para a infecção pelo HCV. Também foram identificados como importantes resíduos nas posições 32 e 48, o qual já tiveram sua importância relatada na proteína claudina-1 (Evans *et al.*, 2007)

No caso dos receptores L-SIGN e DC-SIGN, acredita-se que eles atuem quando o vírus infecta as células dendríticas. Sua expressão não foi evidenciada em

hepatócitos e sim em células dentríticas que facilitam a infecção persistente à medida que capturam e entregam o vírus ao fígado, atuando como transportadores, já que a glicoproteína do envelope viral E2 por sua vez, liga-se ao DC-SIGN e L-SIGN (Cormier *et al.*, 2004; Lozach *et al.*, 2004).

A entrada do vírus HCV na célula hospedeira ocorre por endocitose em um processo mediado pela proteína clatrina (Blanchard *et al.*, 2006). Uma vez dentro da célula, o vírus é transportado dentro de uma vesícula endossomal. Este processo ocorre presumidamente sob baixo pH o qual desencadeia a fusão do envelope lipídico com a membrana celular. Este mecanismo é altamente coordenado e requer alterações conformacionais dramáticas nas proteínas de fusão que são desencadeadas por fatores celulares. (Koutsoudakis *et al.*, 2007). Após a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, o genoma viral é então liberado no citosol da célula hospedeira.

Após a entrada do vírus e liberação do material genético, o IRES promove a iniciação da tradução da poliproteína que precede a produção das proteínas virais. As proteínas estruturais associam-se (capsidial) ou integram-se (E1, E2 e p7) à membrana do retículo endoplasmático (RE) e formam oligômeros funcionais que promoverão a montagem da nova partícula viral. As proteínas não estruturais se associam do lado citoplasmático da membrana do RE onde interagem entre si e com as proteínas hospedeiras para formar a maquinaria de replicação viral. Essa maquinaria usa seu próprio genoma como molde para transcrição de fita complementar negativa de RNA. Essa fita negativa ou dupla fita, por sua vez, serve como uma molécula replicativa intermediária na síntese de uma nova molécula de RNA de polaridade positiva que

pode ser usada para tradução, replicação ou, então, ser empacotada para constituir novos vírions (De Francesco, *et al.*, 2003).

Pouco se sabe a respeito dos passos finais do ciclo de vida viral, que somente recentemente passaram a ser estudados sistematicamente.

Foi evidenciado que a montagem do nucleocapsídeo geralmente envolve a oligomerização da proteína capsidial e o encapsulamento do RNA genômico (Tanaka, *et al.*, 2000). Uma vez formado, o nucleocapsídeo requer um envelope que se forma no interior do Retículo Endoplasmático ou estruturas derivadas. Interações entre a proteína capsidial e as proteínas E1 e E2 são conhecidas por determinar a morfologia do vírus.

Acredita-se que as partículas virais são liberadas da célula por meio de vesículas secretórias.

Em virtude do tratamento atual para a Hepatite C, que se baseia na administração de Interferon alfa mais Ribavirina, não apresentar resultados para 40% a 50% dos pacientes do genótipo 1 e para 30% dos pacientes com genótipo 2 ou 3 (Heathcote *et al.*, 2004) e, também, apresentar efeitos colaterais pouco toleráveis, há a necessidade imediata de se buscar novas drogas anti-HCV mais efetivas e com poucos efeitos colaterais. A serino-protease NS3/4A é considerada um dos alvos mais atrativos para o desenvolvimento de anti-virais.

Neste trabalho sequenciamos a região codificadora da proteína NS3 obtida a partir de 16 pacientes portadores do vírus HCV do genótipo 3. Em seguida, utilizando ferramentas de Bioinformática, modelamos a estrutura das seqüências obtidas e com isso foram visualizadas alterações em regiões da NS3 importantes para o exercício de suas funções.

O conhecimento da estrutura tridimensional pode auxiliar no desenho de inibidores que possam ser utilizados como drogas anti-virais contra o vírus da Hepatite C. A modelagem comparativa é a chave para a descoberta de novas drogas inibidoras, pois permite que a informação genômica possa ser utilizada no desenvolvimento de ligantes alvos ou na melhora da especificidade do ligante à proteína.

Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi identificar alterações na estrutura terciária da proteína NS3 do vírus HCV, por meio da análise de modelagem comparativa das seqüências codificadoras do domínio Protease e Helicase, a partir de 16 pacientes infectados com vírus do genótipo 3.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Confeccionar uma biblioteca contendo as seqüências Protease e Helicase, permitindo que estudos adicionais posteriores possam ser realizados;
- 2) Identificar alterações na seqüência codificadora das porções Protease e Helicase;
- 3) Realizar a modelagem comparativa das seqüências obtidas para visualizar as alterações encontradas e, assim, permitir um melhor entendimento do seu significado;
- 4) Correlacionar as alterações encontradas com a funções enzimáticas da proteína NS3.

***Artigo Original – Structural studies of NS3 from
Hepatitis C virus***

Para submissão ao periódico *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* (ISSN 0887-3585)

Structural studies of NS3 from Hepatitis C virus

Paola J. S. Provazzi¹, Helen A Arcuri², Isabel Maria V. G. C Mello³, João Renato R. Pinho⁴, Mário S. Palma², Paula Rahal¹

1 – Departamento de Biologia – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - UNESP de São José do Rio Preto /SP, Brasil

2 – Departamento de Biologia – Instituto de Biociências de Rio Claro – CEIS – UNESP de Rio Claro/SP

3 – Instituto Butantan. Laboratório de Imunologia Viral. São Paulo/SP, Brasil

4 – Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Medicina, Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo/SP, Brasil

Running title: Structural studies NS3 HCV

Corresponding author: Paula Rahal

Adress: Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth. São José do Rio Preto/SP, Brazil.

CEP: 15054-000.

Tel.: (55) (17) 32212379

Fax: (55) (17) 32212390

e-mail: Rahalp@yahoo.com.br

RESUMO

O vírus da Hepatite C (HCV) infecta 130 milhões de pessoas no mundo. Apesar disso opções terapêuticas mais eficientes ainda não estão disponíveis. Um dos alvos mais promissores para a terapia anti-viral é a proteína não-estrutural 3 (NS3) devido as suas atividades enzimáticas de: i) Protease; ii) NTPase e iii) Helicase. O sucesso com os inibidores de protease do vírus HIV sugere que proteases virais, assim como a NS3/4A do vírus HCV, podem ser um excelente alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Com o objetivo de identificar alterações na estrutura da proteína NS3 foi modelada a seqüência codificadora dessa proteína a partir de 16 pacientes portadores do vírus HCV. No domínio Protease foram evidenciadas substituições na tríade catalítica e na região de ligação ao íon zinco nos pacientes avaliados. Também foram visualizadas alterações na porção Helicase da NS3. As substituições ocorreram nos sítios de ligação ao ATP e ao RNA viral. Ainda foi possível observar uma alteração na quantização da estrutura secundária da proteína Helicase. Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem informações sobre o perfil genético do vírus HCV do genótipo 3, especificamente da região codificadora da proteína NS3, permitindo o conhecimento do genoma viral e a identificação de regiões para ligação de possíveis inibidores. Este trabalho certifica que a modelagem é uma ferramenta útil para a biologia estrutural e funcional, como a aplicação de rotinas de DOCKING usadas com o objetivo de prever a interação sítio-específica com compostos inibidores da Protease.

Keywords: Hepatitis C virus, Protease NS3 HCV, Helicase NS3 HCV, modeling

INTRODUÇÃO

O vírus da Hepatite C (HCV) é o principal agente causador das Hepatites Não-A e Não-B. As manifestações clínicas da infecção pelo vírus incluem as formas aguda e crônica da Hepatite C, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular¹. A estimativa global da prevalência da infecção pelo HCV é de 2,2% o que corresponde a 130 milhões de pessoas HCV positivas no mundo². Apesar disso, opções terapêuticas mais eficientes ainda não estão disponíveis.

O HCV contém um genoma de RNA fita simples positiva com aproximadamente 9.6 kb. Codifica uma única poliproteína precursora que contém de 3008 a 3037 aminoácidos^{3,4,5} e que dá origem a todas as proteínas virais estruturais (S): core (proteína C), envelope 1 (E1), e envelope 2 (E2) e não estruturais (NS): localizadas na seguinte ordem: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B⁶.

O processamento proteolítico das proteínas não estruturais é complexo e requer duas proteases distintas: (i) a metaloprotease dependente de zinco NS2/NS3 e (ii) a serino-protease NS3 localizada na porção N-terminal da NS3^{6,7,8}.

Um dos alvos mais promissores para a terapia anti-viral é a proteína não-estrutural 3 (NS3) devido as suas atividades enzimáticas de: i) Protease; ii) ATPase e iii) Helicase^{9,10}.

A NS3 é uma proteína hidrofóbica de aproximadamente 69 kDa com a função serino-protease codificada em sua extremidade N-terminal correspondendo a um terço da proteína. Esta região liga-se não covalentemente ao seu cofator, a proteína NS4A que possui 54 aminoácidos, para que seja exercida sua função protease na clivagem da poliproteína. A tríade catalítica é formada pelos resíduos His57, Asp81 e Ser139 do

genoma viral. A porção central da proteína NS4A é importante para o processamento eficiente das proteínas não estruturais pela NS3.

A proteína possui ainda o íon zinco tetraedricamente coordenado por Cys97, Cys99, Cys145 e His149 a molécula de água. Um possível papel para o íon zinco é induzir estabilidade no sítio ativo por meio da fita β D2, a qual separa o sítio ativo Ser139 e um dos ligantes do sítio do zinco Cys145⁶.

A porção C-terminal da proteína não estrutural NS3 corresponde ao domínio Helicase o qual possui atividades NTPase (*RNA-stimulated nucleoside triphosphatase*) e RNA Helicase. A atividade Helicase é indispensável para replicação viral *in vivo*, presumivelmente por linearizar a fita de RNA durante o processo de replicação, permitindo a amplificação do RNA e, conseqüentemente, a síntese da poliproteína precursora viral¹¹.

A Helicase é constituída por três domínios. Quando vista como um molécula em forma de Y o domínio 1 N-terminal e o domínio 2 ficam acima do domínio 3 C-terminal¹².

A principal diferença entre as estruturas de HCV já conhecidas^{13,14,15,16}, diz respeito à posição do domínio 2 em relação aos domínios 1 e 3. Os domínios 1 e 3 compartilham mais de uma interface do que o domínio 2 compartilha com cada um dos outros domínios¹¹.

O domínio 2 conecta-se aos domínios 1 e 3 *via* conectores flexíveis, permitindo a ele rotacionar-se livremente em relação aos domínios 1 e 3. Em algumas estruturas o domínio 2 gira afastado do domínio 1 adquirindo uma

conformação aberta, enquanto em outras estruturas o domínio 2 fica mais próximo ao domínio 1 adquirindo uma conformação fechada¹².

Foi observado que dois motivos localizados no domínio 2 são conservados em todos os isolados de HCV mas não em proteínas relacionadas e, portanto, atuariam como possíveis sítios para a ligação de inibidores exclusivos para a Helicase do vírus¹². O primeiro deles concentra-se na arginina na posição 393 (Arg393) da NS3, um resíduo que entra em contato com a estrutura central do ácido nucléico¹². Foi sugerido que este motivo *Arg-clamp* (Arg393) funcione como um elo que conecta a proteína ao ácido nucléico por meio do qual ocorre o seu deslocamento¹⁷. O segundo motivo forma um *loop* que conecta duas folhas- β que se estendem do domínio 2. Esta estrutura é composta pelos aminoácidos treonina na posição 430 (Thr430), alanina na posição 452 (Ala452) e também pelo par de resíduos, Phe438 e Phe444 e está localizada em uma região altamente conservada da extremidade do *loop*. O giro do *loop* é composto dos aminoácidos Phe438 a Phe444, e até o momento, sua função têm sido motivo de pesquisas. Mais propriamente, Phe438 e Phe444 são importantes tanto para a manutenção da estrutura final da proteína quanto para a modulação das alterações conformacionais que levam a liberação do material genético mediante a ligação do ATP¹⁷.

Em virtude do tratamento atual para a Hepatite C, que se baseia na administração de Interferon alfa mais Ribavirina, não apresentar resultados para 40% a 50% dos pacientes do genótipo 1 e para 30% dos pacientes com genótipo 2 ou 3¹⁸ e, também, apresentar afeitos colaterais pouco toleráveis, há a necessidade imediata de se

buscar novas drogas anti-HCV mais efetivas e com poucos efeitos colaterais. A serino-protease NS3/4A é considerada um dos alvos mais atrativos para o desenvolvimento de anti-virais. O sucesso com os inibidores de protease do vírus HIV sugere que proteases virais assim como a NS3/4A do vírus HCV possam ser um excelente alvo para o desenvolvimento de novas drogas.

Com o objetivo de identificar alterações na estrutura da proteína NS3 sequenciamos a região codificadora desta proteína, obtida a partir de 16 pacientes portadores do vírus HCV do genótipo 3. Em seguida, utilizando ferramentas de Bioinformática, modelamos a estrutura das seqüências obtidas e, com isso, foram visualizadas alterações em regiões importantes da NS3, tanto no domínio Protease quanto no domínio Helicase. O conhecimento da estrutura tridimensional pode auxiliar no desenho de inibidores que possam ser utilizados como drogas anti-virais contra o vírus da Hepatite C. A homologia ou modelagem comparativa é a chave para a descoberta de novas drogas inibidoras, pois permite que a informação genômica possa ser utilizada no desenvolvimento de ligantes alvos ou na melhora da especificidade do ligante a proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

População e amostras

As amostras foram compostas por 16 pacientes infectados com o vírus da Hepatite C do genótipo 3, tratados no Hemocentro de São José do Rio Preto/SP. Após confirmação de diagnóstico positivo da infecção, definida pela positividade na pesquisa de anticorpos para o vírus por ELISA e RNA por PCR Qualitativo, os

pacientes foram submetidos a 24 semanas de tratamento com Interferon alfa e Ribavirina. Para avaliar a resposta ao tratamento, foram acompanhados por até 6 meses após o término da medicação. Nesse período foram realizadas coletas de soro dos pacientes em 12 e 24 semanas de tratamento, e em 7, 14, 21 e 28 dias e, mensalmente, por até 6 meses após o término da administração dos medicamentos. Foram considerados como critérios de exclusão a co-infecção com o vírus da Imunodeficiência humana (HIV) e/ou com o vírus da Hepatite B (HBV).

O material de estudo corresponde a amostras de sangue (soro) dos 16 pacientes pertencentes a população de estudo.

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e está de acordo com a resolução 196/96 do conselho nacional de Saúde sendo aprovado com parecer de número 087/2004.

Extração do RNA e Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa foi processada em volume de 20,0 µl. Utilizando um oligonucleotídeo iniciador randômico, as reações foram realizadas de acordo com as especificações do *High-Capacity Archive Kit* (Applied Biosystems). A mistura foi mantida a 25°C, por 10 minutos e a 37°C, por 2 horas. Este material foi amplificado, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para a porção Protease e para a porção Helicase da NS3.

Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a seqüência codificadora do domínio Protease (*Forward* 5'GGAATTCCCATATGCCCCGATCACAGCATAC3' com sítio *NdeI* sublinhado e *Reverse* 5'CGCGGATCCTCAAGTTGAATTGTCAGAGAAAGATGGGGA3' com sítio *BamHI* sublinhado) localizado na região amino-terminal da proteína NS3 (1-180 aa). Os iniciadores amplificam fragmentos de 540 pares de bases para a porção Protease. Para o domínio Helicase (181-631 aa) os oligonucleotídeos iniciadores (*Forward* 5'GGAATTCCCATATGTCCCCATCTTTCTCTGACAATTCAACT3' com sítio *NdeI* sublinhado e *Reverse* 5'CGCGGATCCTCAGGTGGTTACTTCCAGATC3' com sítio *BamHI* sublinhado) geram produtos de amplificação com 1353 pares de bases. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados contendo sítios de restrição para as enzimas BamHI e NdeI, para possibilitar a ligação dos fragmentos amplificados no vetor de expressão PET 28A, que também possui sítios de restrição para estas endonucleases. Também foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores internos a seqüência completa da NS3 para possibilitar seu seqüenciamento completo (*Seq787F* 5'GCCAAA CTGACCTATTCCAC3'; *Seq980F* 5'AGCATCACTGTGCCACATTC3'; *Seq1216F* 5'GTCGTA GTTTGCCTACTG3'; *Seq1654R* 5'GCTTAGTCTGTGACAGAAAGTG3'; *Seq1454R* 5'ATT CCAGACGGTCTTTCACC3'; *Seq1005R*

5'GTTAGAATGTGGCACAGTGATG3'; *M13 Forward* 5
'GTAAAACGACGGCCAG3'; *M13 Reverse* 5' CAGGAAACAGCTATGAC3').

Amplificação do cDNA para os domínios Protease e Helicase

As reações foram processadas em 20µl, contendo 100 a 500 ng de cDNA, Tampão 1,6x, dNTP mix (200 µM), MgCl²⁺ (4,0 mM), oligonucleotídeos iniciadores (0.5 µM) e *Taq DNA Polimerase* (5 unidades). Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA (controle de contaminação). A ciclagem compreendeu uma etapa inicial de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores em temperaturas de 60°C para Protease e 55°C para Helicase, e 3 minutos a 72°C para extensão das cadeias, além de 15 minutos a 72°C para extensão final. Os oligonucleotídeos iniciadores geram produtos de amplificação com 540 pares de bases (Protease) e 1350 pares de bases (Helicase).

Clonagem

Após a certificação da amplificação dos fragmentos de interesse, estes foram clonados no vetor de clonagem pCR-XL-TOPO. As etapas de ligação do plasmídeo com o fragmento de interesse, assim como a transformação em bactérias quimicamente competentes (TOP10), foram processadas de acordo com as especificações do Kit de clonagem *Topo XL PCR Cloning Kit* (Invitrogen, Life technologies). As bactérias foram crescidas a 37°C em meio de cultura sólido LB, contendo 50 µg/ml do antibiótico Kanamicina. Para confirmação da inserção do produto de interesse no vetor, após aproximadamente 16 horas de crescimento, foi

realizada uma reação de amplificação do DNA plasmidial utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13 *forward* e M13 *reverse*. As reações foram processadas em 15µl, contendo 1,0µl da cultura, Tampão 1,0x, dNTP mix (125 µM), MgCl²⁺ (1,5 mM), oligonucleotídeos iniciadores (0.14 µM) e *Taq DNA Polimerase* (5 unidades). Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu a cultura (controle de contaminação).

A ciclagem compreendeu uma etapa inicial de 3 minutos, a 95°C; 35 ciclos de 40 segundos, a 95°C; 40 segundos, para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, a 55°C e 55 segundos, a 72°C, para extensão das cadeias, além de 10 minutos, a 72°C, para extensão final. Os oligonucleotídeos iniciadores geram produtos de amplificação com, aproximadamente, 150 (plasmídeo), 690 (Protease + plasmídeo) e 1500 (Helicase + plasmídeo) pares de bases.

Em seguida, os clones positivos foram selecionados e inoculados em 3,5 ml de meio de cultura líquido LB contendo 50 µg/ml de Kanamicina. De cada paciente foram selecionados cinco clones do fragmento Protease e cinco clones do fragmento Helicase para serem purificados e seqüenciados. O crescimento foi realizado a 37°C sob agitação (250 RPM) por aproximadamente 16 horas. Em seguida, os plasmídeos foram purificados a partir da cultura de bactérias, seguindo as instruções do *S.N.A.P. Miniprep Kit* (Invitrogen, Life technologies).

Seqüenciamento

Os fragmentos clonados e purificados foram seqüenciados em seqüenciador automático *ABI Prism 377 (Applied Biosystems Inc)* para confirmação de suas

seqüências nucleotídicas. A reação de seqüenciamento foi processada em 10,0µl contendo: *Big Dye Terminator* (2,0µl), Tampão *Save Money* (2,5x), oligonucleotídeo iniciador (1,0µM) e 2,0µl da amostra de fragmentos clonados. A ciclagem compreendeu uma primeira etapa de 10 segundos, a 96°C; 35 ciclos de 10 segundos, a 96°C; 5 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores em temperatura de 50°C e 3 minutos, a 60°C, para extensão das cadeias. Foi proposto para o sequenciamento cinco clones de cada amostra do fragmento Protease e cinco clones de cada amostra do fragmento Helicase. Para o sequenciamento dos produtos de amplificação correspondentes ao domínio Protease (540 pares de bases) foram necessários apenas os oligonucleotídeos iniciadores M13 *Forward* e M13 *Reverse*, que são complementares a seqüência do vetor. Assim foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada clone de cada amostra. Já para o sequenciamento dos produtos de amplificação correspondentes ao domínio Helicase (1353 pares de bases) foram necessários, além dos iniciadores M13 *Forward* e M13 *Reverse*, mais três pares de oligonucleotídeos iniciadores internos à seqüência para abranger todo o produto de amplificação de 1353 pares de bases. Com isso, foram necessárias oito reações de sequenciamento para cada clone para cada amostra.

Análise das seqüências e da estrutura secundária

A avaliação inicial quanto à confirmação das seqüências obtidas, a partir dos clones serem de NS3 foi realizada utilizando a ferramenta de alinhamento PSI-BLAST^{19,20}. Em seguida, as seqüências foram analisadas quanto à qualidade utilizando programa PHRED/PHRAP/CONSED disponível no *site*

<http://adenina.biomol.unb.br/phph>. Além de avaliar a qualidade das seqüências o programa permite a montagem de seqüências consenso, e com esse objetivo, a partir das seqüências M13 *Forward* e M13 *Reverse* do fragmento Protease, foi montada uma única seqüência consenso para cada clone de cada amostra. Para o fragmento Helicase, a seqüência consenso (*contig*) de cada clone foi montada a partir dos quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores.

Para o alinhamento múltiplo das seqüências de NS3 foi utilizada a ferramenta de alinhamento *CLUSTAL W*²¹, para identificar possíveis regiões onde ocorreram as substituições e os resultados dos alinhamentos foram editados utilizando o programa Jalview²².

Para a identificação de proteínas homólogas à NS3 foi utilizada a ferramenta de alinhamento PSI-BLAST^{19,20} contra o banco de dados de estruturas de proteínas (PDB)²³; os moldes escolhidos para serem usados durante a modelagem são mostrados na tabela 1.

A predição da estrutura secundária da NS3 foi feita utilizando o programa *JNET Secondary Structure Prediction*²⁴ para identificar possíveis mudanças na estrutura secundária por causa das mutações ocorridas nos clones.

Modelagem Molecular

A modelagem molecular comparativa de estruturas de proteínas é um método computacional que tem o potencial de construir um modelo 3D para uma proteína de estrutura desconhecida (o alvo) baseada em uma ou mais proteínas relacionadas de estruturas conhecidas (os moldes) com precisão e confiança

comparáveis às estruturas experimentais de baixa resolução a partir da seqüência de aminoácidos^{25,26,27,28}.

Para a modelagem molecular da NS3 utilizamos o programa MODELLER²⁵ que usa distância geométrica e técnicas de otimização para modelagem molecular por satisfação das restrições espaciais²⁹. A modelagem molecular inicia-se com um alinhamento entre a seqüência da proteína a ser modelada e a(s) seqüência(s) da(s) proteína(s) molde(s), este alinhamento é usado como uma das entradas que o programa MODELLER utiliza para construir o modelo. Um total de 1000 modelos foi gerado para cada clone e a seleção dos melhores modelos foi baseada na qualidade estereoquímica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise das substituições nas seqüências

NS3 Protease

A análise do alinhamento múltiplo realizado com as seqüências obtidas no sequenciamento do fragmento Protease, mostraram a ocorrência de substituições em resíduos importantes da Protease como na tríade catalítica (His57; Asp81; Ser139) e no sítio de ligação ao íon zinco (Cys97; Cys99; Cys145), essenciais para a sua atividade. A substituição do resíduo Asp81 foi observada nos pacientes RF059 e RF145. As trocas foram para os resíduos alanina e valina respectivamente. As posições dos aminoácidos His57, Asp81 e Ser139 no sítio ativo protéico são estritamente conservados entre as seqüências de HCV.

No sítio de ligação ao íon zinco a substituição ocorreu no resíduo Cys99. O paciente RF059, além da substituição na tríade catalítica, apresentou a troca do resíduo Cys99 para Ser99. Neste sítio o íon zinco se une à Cys97, Cys99 e Cys145 e à uma molécula de água por meio de um resíduo de His149, para construir uma estrutura em forma de tetraedro (Figura1).

NS3 Helicase

No domínio Helicase, os aminoácidos envolvidos na hidrólise do ATP, contados a partir da protease são: Lys210, Arg467, Glu291, Gln460, His293 e Asp290. E na região envolvida na ligação ao RNA viral os aminoácidos envolvidos são: Thr269, Trp510, Glu493, Arg393, Thr411, His369 e Thr450. A análise do alinhamento múltiplo das seqüências do fragmento Helicase obtidas, evidenciaram substituições em resíduos importantes da Helicase como na região na qual ocorre a hidrólise do ATP (sítio de ligação ao ATP) e na região de ligação ao RNA. No sítio de ligação ao ATP o paciente RF007 mostrou a substituição do aminoácido Lys210 para Glu210. Na região onde ocorre a ligação ao RNA todos os pacientes mostraram a substituição do resíduo Trp510 para Thr510. Na regiões do *loop* de fenilalanina (Phe438 e Phe444) e em sua extremidade, que corresponde a uma região hidrofóbica, (Phe531, Phe536 e Trp532) não foram encontradas substituições. O resíduo de arginina na posição 393, importante para o desenho de inibidores específicos para NS3 do HCV também foi avaliada e não mostrou alterações (Figura 2).

Comparação das Seqüências Primárias

Foi avaliada a porcentagem de identidade e similaridade das seqüências primárias das porções Protease e Helicase comparadas às seqüências primárias dos moldes (1DXP e 1CU1). Os resultados estão apresentados na tabela 1 e indicam que essas estruturas são bons moldes a serem considerados para a modelagem de ambas (tabela 1).

A identidade entre os resíduos da Protease está apresentada na figura 1 e entre os resíduos da Helicase está apresentada na figura 2. Por meio destes alinhamentos podemos observar claramente os pontos onde existem as substituições. Após uma observação criteriosa foi evidenciado que em 43,75% dos pacientes as substituições foram para resíduos do mesmo grupo bioquímico (similares) e em 56,25% dos pacientes as substituições foram para resíduos de grupos bioquímicos diferentes, podendo ocasionar uma mudança na interação com o meio e na afinidade entre a proteína e o ligante.

Ainda pelas figuras 1 e 2 é possível observar o resultado da predição da estrutura secundária entre as seqüências dos moldes e dos modelos. Por meio da predição da estrutura da Helicase foi constatado que as substituições causam uma mudança sutil na quantização de estruturas secundárias na proteína, esta modificação pode ser vista mais claramente no tópico abaixo onde descrevemos a estrutura, já que para a porção protease esta mudança na quantização de estrutura e nível secundário não foi observada.

Descrição da estrutura 3D dos modelos

A proteína NS3 apresenta dois domínios e é bifuncional. O domínio serino-protease localiza-se na região amino-terminal e o domínio Helicase localiza-se na região carboxi-terminal. Com isso, a NS3 apresenta três funções enzimáticas que são; 1) atividade de protease; 2) ATPase e 3) Helicase. A função protease relaciona-se a tradução da proteína precursora e as funções ATPásica e Helicase tem grande participação na replicação do material genético viral^{30,31}.

NS3 Protease

O complexo central da Protease NS3 consiste em dois domínios estruturais. O domínio N-terminal (resíduos 1–92), contém oito folhas β antiparalelas, incluindo uma fita correspondente ao cofator NS4A. O domínio C-terminal (resíduos 93 – 180), é constituído por seis folhas β antiparalelas formando um cilindro (β Barrel), comum a todos os membros da família das quimiotripsinas, seguida por uma alfa hélice estruturalmente conservada.

Os modelos da protease NS3 são similares à estrutura do molde, devido à alta identidade entre si. Os elementos da estrutura terciária foram gerados pelo programa PYMOL e mostram que não foram observadas diferenças estruturais na estrutura secundária (Figura 3A – C).

NS3 Helicase

A porção Helicase da NS3 é constituída por três domínios. Quando vista como um molécula em forma de Y o domínio 1 N-terminal e o domínio 2 ficam acima do domínio 3 C-terminal.

O domínio 2 conecta-se aos domínios 1 e 3 *via* conectores flexíveis, o qual permite a ele rotacionar-se livremente em relação aos domínios 1 e 3. Em algumas estruturas o domínio 2 gira afastado do domínio 1 adquirindo uma conformação aberta, enquanto em outras estruturas o domínio 2 fica mais próximo ao domínio 1 adquirindo uma conformação fechada.

O ponto central dessas rotações é dado por contatos adicionais entre o domínio 3 e uma fita β originada do domínio 2³².

Para a porção Helicase foi observado que as substituições alteram sutilmente a quantização da estrutura secundária, há uma diminuição na quantização das fitas e um aumento nas regiões de estruturas randômicas, o que ocasiona uma sutil mudança na estrutura destas proteínas de NS3. Como se trata de modelos teóricos futuramente serão utilizadas técnicas experimentais para confirmar essas diferenças estruturais observadas na porção Helicase e verificar se há diminuição da sua afinidade com os ligantes. Os elementos da estrutura terciária são mostrados na figura 4A – C e foram gerados pelo programa PYMOL.

Análise dos modelos construídos

Os modelos foram construídos baseados nas coordenadas atômicas de estrutura protéica resolvida por biocristalografia (1DXP e 1CU1). As coordenadas

atômicas de todas as moléculas de água foram retiradas do molde. Após a etapa inicial de escolha do melhor modelo, análises mais criteriosas e detalhadas foram efetuadas com a utilização dos *softwares* VERIFY 3D³³, WHATCHECK³⁴, X-PLOR^{35,36} e PROCHECK³⁷, a fim de verificar a qualidade do modelo construído.

A qualidade estereoquímica dos modelos gerados apresenta mais de 90% dos ângulos de ligação phi (Φ) e psi (ψ) da cadeia principal (ângulos referentes as ligações C $_{\alpha}$ -N e C $_{\alpha}$ -C), distribuídos nas regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandran e os valores do G-factor global indicaram uma boa qualidade estereoquímica tanto para a cadeia principal como para as cadeias laterais dos resíduos.

Foi verificado por meio do programa VERIFY 3D que os modelos finais têm compatibilidade entre a seqüência primária e a estrutura 3D construída, pois o valor obtido para os modelos está bem acima do limite de 45%.

Os valores do RMSD da geometria ideal para o comprimento e ângulo de ligação (avaliados pelo *software* X-PLOR) ficaram abaixo de 0,06Å e 4°, respectivamente, indicando que as estruturas dos modelos como um todo está em equilíbrio geométrico.

Utilizando o programa WHATCHECK foi constatado que os ambientes químicos de resíduos individuais dos modelos se enquadram nos padrões freqüentemente encontrados em estruturas protéicas resolvidas por métodos experimentais.

Os resultados indicam que estes modelos podem ser utilizados para o estudo estrutural e funcional das proteínas de NS3, bem como, para estudos de *docking*

entre a proteína e os ligantes analisando assim o comportamento destes ligantes perante as substituições ocorridas na NS3.

Análise da tríade catalítica da Protease

Por meio da avaliação dos alinhamentos das seqüências da porção Protease, foi verificado que tanto o paciente RF059 quanto o paciente RF145 apresentaram a substituição de um resíduo no sítio ativo da Protease do HCV (tríade catalítica) (Figura 5A). No caso do paciente RF059 ocorre a substituição do aminoácido Asp81 para Ala81 (Figura 5B) e no paciente RF145 ocorre a substituição do aminoácido Asp81 para Val81 (Figura 5C).

Yamada e colaboradores, em 1998, observaram que a troca do aminoácido histidina para leucina na posição 57 (um dos resíduos do sítio ativo) ocasionou a perda da função protease.

A Protease do vírus HCV adota um dobramento como das quimiotripsinas que possuem um sítio ativo formado pelos resíduos His57, Ser195 e Asp102. Assim o mecanismo de ação catalítico das quimiotripsinas pode ser extrapolado para a Protease NS3. Durante a ação catalítica das quimiotripsinas há a formação de um composto intermediário tetraédrico no qual os aminoácidos essenciais para a ação enzimática são a histidina e a serina sendo que esta última desempenha um papel de resíduo reativo que ataca o carbono do grupamento carbonila do peptídeo substrato. Quando o oxigênio da serina ataca o carbono carbonila de uma ligação peptídica, a His57 funciona como uma base geral e abstrai o próton da serina, enquanto o Asp102, que é carregado negativamente, estabiliza a carga negativa

que se forma no resíduo de histidina. Isto previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da serina e aumenta sua nucleofilicidade³⁹.

No caso das duas substituições encontradas o aminoácido Asp81 que é carregado negativamente foi substituído por resíduos apolares (alanina e valina). Com isso, o que se observa é que a função do ácido aspártico em equilibrar as cargas na tríade catalítica durante a catálise é abolida quando trocado pelos resíduos Val81 e Ala81. As trocas também podem influenciar a interação com o substrato, pois os aminoácidos valina e alanina são importantes na promoção de interações hidrofóbicas no interior das estruturas protéicas.

Análise do sítio de ligação ao zinco da Protease

A análise das seqüências do fragmento Protease revelaram ainda que o paciente RF059 mostrou a substituição do resíduo Cys99 para Ser99 (ambos polares não-carregados). Neste sítio o íon zinco se une à Cys97, Cys99 e Cys145 e a uma molécula de água por meio de um resíduo de His149 para constituir uma estrutura em forma de tetraedro. Um possível papel para o íon zinco pode ser induzir estabilidade no sítio ativo por meio da fita β D2, a qual separa o sítio ativo Ser139 e um dos ligantes do sítio do zinco Cys145. O sítio de ligação ao zinco também está localizado próximo a interface dos dois domínios da protease e pode participar na conformação desses domínios o qual contribuem para a formação do encaixe entre os aminoácidos do sítio ativo e o substrato³⁵.

Tedbury e colaboradores, em 2007, confirmaram a participação do íon zinco na atividade autoclivagem NS2/NS3 e demonstraram que os três resíduos de cisteína

(Cys97, Cys99 e Cys145), necessários para a atividade protease da NS3, também são essenciais para a atividade de autoclivagem. O quarto resíduo do sítio do Zinco, His149 não apresentou atuação na autoclivagem. Por outro lado, o resíduo Cys922 foi identificado como um quarto aminoácido necessário à atividade da NS2/NS3, resíduo este que até o momento não se mostrou essencial para atividade protease da NS3. Isto levou os autores a proporem uma possível explanação sobre a sequência de ativação dessas duas proteases. Este modelo prediz que quando o zinco está coordenado ao resíduo Cys922 juntamente com Cys97, Cys99 e Cys145, o precursor está competente para a NS2/NS3 autoclivagem. Quando o quarto resíduo coordenado for a His149 o precursor assume a atividade protease da NS3.

Mutações de ponto nos resíduos Cys97, Cys99, Cys145 e His149 para alanina mostram que a remoção de qualquer um tem um impacto negativo na função protease⁶.

A cisteína é única entre os aminoácidos, pois tem um grupo tiol que pode formar uma ponte dissulfeto com outra cisteína por meio da oxidação dos dois grupos tiol. Assim, apesar do paciente RF059 apresentar a substituição para um resíduo similar (serina), acreditamos que essa troca pode prejudicar a estabilidade da estrutura protéica em razão da perda de uma ponte dissulfeto entre as cisteínas do sítio de ligação ao íon zinco (Figura 6A e 6B).

Análise do sítio de ligação ao ATP da Helicase

A análise das seqüências do fragmento Helicase revelaram a substituição do aminoácido lisina por ácido glutâmico na posição 30 da Helicase ou 210 da NS3 no paciente RF007 (Figuras 7A e 7B).

A porção C-terminal da proteína não estrutural NS3 corresponde ao domínio helicase o qual possui atividades NTPase (*RNA-stimulated nucleoside triphosphatase*) e RNA helicase. A atividade helicase é indispensável para replicação viral *in vivo*, presumivelmente por linearizar a fita de RNA durante o processo de replicação, permitindo a amplificação do RNA, e conseqüentemente, a síntese da poliproteína precursora viral.

Os motivos I, Ia, II, III, IV, V, e VI, localizados nos domínios 1 (região onde ocorre a hidrólise do ATP) e 2 da Helicase constituem o motor que converte a energia química derivada da hidrólise do ATP em uma força química que guia o movimento da Helicase levando a ruptura dos pares de bases do DNA ou RNA.

A atuação da maioria dos resíduos conservados nos motivos I a VI são investigados usando mutações sítios dirigidas^{42,43,44}. Mutações nos motivos I a VI normalmente causam impacto na habilidade da proteína em desenrolar o material genético assim como na hidrólise do ATP, mostrando que estas duas atividades agem conjuntamente. Aqui, nós evidenciamos a troca de um resíduo carregado positivamente para um carregado negativamente (Figuras 7A e 7B) o que pode causar alterações na distribuição de cargas e na interação entre os aminoácidos e, conseqüentemente, interferir na hidrólise do ATP.

Análise da região de ligação ao RNA da Helicase

Neste trabalho foi evidenciada a substituição do aminoácido triptofano por treonina na posição 330 da Helicase ou 510 da NS3 em todos os pacientes avaliados (Figuras 8A e 8B). Este aminoácido localiza-se na região em o que RNA se liga a Helicase para que ela exerça sua função.

A porção helicase da NS3 é constituída por três domínios. Quando vista como um molécula em forma de Y o domínio 1 N-terminal e o domínio 2 ficam acima do domínio 3 C-terminal. Em duas das estruturas descritas^{14,45}, aparecem oligonucleotídeos ligados à helicase na fissura que separa o domínio 3 dos domínios 1 e 2.

Mutações nos motivos I a VI normalmente causam impacto na habilidade da proteína em desenrolar o material genético assim como na hidrólise do ATP, mostrando que estas duas atividades agem conjuntamente^{37,38,39}. Neste estudo foi observada a substituição de um resíduo hidrofóbico (não polar) por um hidrofílico o que leva a perda de hidrofobicidade na região onde ocorreu a substituição e, conseqüentemente, modifica a interação da proteína com o meio.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem informações sobre o perfil genético do vírus HCV do genótipo 3 especificamente da região codificadora da proteína NS3, permitindo o conhecimento do genoma viral e a identificação de regiões para ligação de possíveis inibidores específicos. Quando identificada uma alteração em uma seqüência viral que justifique a resistência a um dado inibidor, o

conhecimento da variabilidade genômica permite o combate a doença por meio do conhecimento e da disponibilidade de ação de outra droga específica para outra região. Nesse sentido, acreditamos que a terapia futura para a Hepatite C será baseada na utilização de uma combinação de inibidores para diferentes regiões do genoma viral como ocorre com o tratamento do HIV no qual é utilizado um coquetel de inibidores para diferentes proteínas virais.

Este projeto aumenta a certeza de que a modelagem é uma ferramenta útil para a biologia estrutural e funcional, como a aplicação de simulações de DOCKING usadas com o objetivo de prever a interação sítio-específica com compostos inibidores da Protease.

Com isso, os modelos obtidos fornecerão informações úteis a respeito da proteína NS3 e, também, contribuirão para o desenho de nova drogas anti-virais.

REFERÊNCIAS

1. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.
2. World Health Organization. <<http://www.who.int/en/>>.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244(4902):359-362.
4. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(24):9524-9528.
5. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991;65(3):1105-1113.
6. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67(8):4665-4675.
7. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993;67(5):2832-2843.
8. Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C, Chien D, Kuo C, Houghton M. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 6):1103-1113.
9. Kwong AD, Kim JL, Lin C. Structure and function of hepatitis C virus NS3 helicase. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:171-196.
10. Gordon CP, Keller PA. Control of hepatitis C: a medicinal chemistry perspective. *J Med Chem* 2005;48(1):1-20.
11. Frick DN. The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol* 2007;9(1):1-20.

12. Frick DN, Rypma RS, Lam AM, Frenz CM. Electrostatic analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase reveals both active and allosteric site locations. *Nucleic Acids Res* 2004;32(18):5519-5528.
13. Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong AD, Le HV, Weber PC. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* 1997;4(6):463-467.
14. Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 1998;6(1):89-100.
15. Cho HS, Ha NC, Kang LW, Chung KM, Back SH, Jang SK, Oh BH. Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J Biol Chem* 1998;273(24):15045-15052.
16. Yao N, Reichert P, Taremi SS, Prosis WW, Weber PC. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure* 1999;7(11):1353-1363.
17. Lam AM, Keeney D, Frick DN. Two novel conserved motifs in the hepatitis C virus NS3 protein critical for helicase action. *J Biol Chem* 2003;278(45):44514-44524.
18. Heathcote EJ. Prevention of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S294-302.
19. Schaffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV, Altschul SF. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* 2001;29(14):2994-3005.
20. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25(17):3389-3402
21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673-4680.
22. Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 2004;20(3):426-427.

23. Berman HM, Bhat TN, Bourne PE, Feng Z, Gilliland G, Weissig H, Westbrook J. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat Struct Biol* 2000;7 Suppl:957-959.
24. Cuff JA, Barton GJ. Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* 2000;40(3):502-511.
25. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234(3):779-815.
26. Sali A. Modeling mutations and homologous proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1995;6(4):437-451.
27. Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:291-325.
28. Fiser A, Feig M, Brooks CL, 3rd, Sali A. Evolution and physics in comparative protein structure modeling. *Acc Chem Res* 2002;35(6):413-421.
29. Fiser A, Do RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* 2000;9(9):1753-1773.
30. Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrenner P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 1993;67(10):6152-6158.
31. Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 1996;70(12):8477-8484.
32. Echols N, Milburn D, Gerstein M. MolMovDB: analysis and visualization of conformational change and structural flexibility. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):478-482.
33. Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three dimensional profiles. *Nature* 1992;356(6364):83-85.
34. Hoof RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. Errors in protein structures. *Nature* 1996;381(6580):272.
35. Schwieters CD, Kuszewski JJ, Tjandra N, Clore GM. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson* 2003;160(1):65-73.
36. BRÜNGER, A. T.; X-PLOR Version 3.1: A System for Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, 1992.

37. LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; SMITH, D.K.; JONES, D.T.; HUTCHINSON, E.G.; MORRIS, A.L.; NAYLOR, D.; MOSS, D.S. & THORNTON, J.M. PROCHECK v.3.0 – Program to check the stereochemistry quality of protein structures – Operating instructions, 1994.
38. Yamada K, Mori A, Seki M, Kimura J, Yuasa S, Matsuura Y, Miyamura T. Critical point mutations for hepatitis C virus NS3 proteinase. *Virology* 1998;246(1):104-112.
39. Voet D, Voet GJ, Pratt CW. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artes Médicas; 2000. 931 p.
40. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996;87(2):343-355.
41. Tedbury PR, Harris M. Characterisation of the role of zinc in the hepatitis C virus NS2/3 auto-cleavage and NS3 protease activities. *J Mol Biol* 2007;366(5):1652-1660.
42. Tai CL, Pan WC, Liaw SH, Yang UC, Hwang LH, Chen DS. Structure-based mutational analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol* 2001;75(17):8289-8297.
43. Kim JW, Seo MY, Shelat A, Kim CS, Kwon TW, Lu HH, Moustakas DT, Sun J, Han JH. Structurally conserved amino acid w501 is required for RNA helicase activity but is not essential for DNA helicase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J Virol* 2003;77(1):571-582.
44. Frick DN, Rypma RS, Lam AM, Frenz CM. Electrostatic analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase reveals both active and allosteric site locations. *Nucleic Acids Res* 2004;32(18):5519-5528.
45. Mackintosh SG, Lu JZ, Jordan JB, Harrison MK, Sikora B, Sharma SD, Cameron CE, Raney KD, Sakon J. Structural and biological identification of residues on the surface of NS3 helicase required for optimal replication of the hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2006;281(6):3528-3535.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alinhamento múltiplo das seqüências da protease NS3 mostrando as substituições encontradas. A identidade entre os resíduos está colorida em azul mais escuro para resíduos idênticos ao azul mais claro para resíduos não idênticos. Os símbolos observados correspondem: ● sítio de ligação ao íon zinco e ■ tríade catalítica. Para a predição da estrutura secundária as hélices são as regiões em vermelho e as fitas em verde, já as regiões randômicas estão em preto.

Figura 2: Alinhamento múltiplo das seqüências da Helicase NS3 mostrando as substituições encontradas. A identidade entre os resíduos está colorida em azul mais escuro para resíduos idênticos e em azul mais claro para resíduos não idênticos. Os símbolos observados correspondem: ● sítio de ligação ao ATP, * sítio de ligação ao DNA, ■ *loop* de fenilalanina e ● a extremidade do *loop* (região hidrofóbica). As posições dos resíduos correspondem à seqüência codificadora do domínio Helicase e não à NS3 na qual devem ser acrescentados mais 180 resíduos. Para a predição da estrutura secundária as hélices são as regiões em vermelho e as fitas em verde, já as regiões randômicas estão em preto.

Figura 3: Diagrama da estrutura terciária: (A) 1DXP (*template*), (B) paciente RF145, (C) paciente RF096. Sendo as hélices em azul, as fitas em rosa, a NS4 em pink, o coil em cinza, íon zinco em azul escuro, e os resíduos que estão

na forma *stick* na região superior da proteína é o sitio da tríade e na região de baixo o sitio do zinco e em vermelho o oxigênio.

Figura 4: Diagrama da estrutura terciária: (A) 1CU1 (*template*), (B) paciente RF059, (C) paciente RF082. Sendo as hélices em verde claro, as fitas em pink e o coil em rosa claro.

Figura 5: Sítio ativo da Protease. (A) Template. (B) Paciente RF059. (C) Paciente RF145.

Figura 6: Sítio de ligação ao íon zinco da Protease NS3. (A) Template. (B) Paciente RF059 clone 2.

Figura 7: Resíduos chave envolvidos na ligação do ATP. (A) Template (PDB 1A1V Kim *et al.*, 1998). (B) Paciente RF007 clone 17 que apresenta a substituição do aminoácido lisina na posição 210 da NS3 por ácido glutâmico.

Figura 8: (A) Resíduos chave em contato com um oligonucleotídeo ligado a Helicase Template (PDB 1A1V Kim *et al.*, 1998). (B) Todos os pacientes apresentaram a substituição do aminoácido triptofano por treonina na posição 510 da NS3.

Figura 1

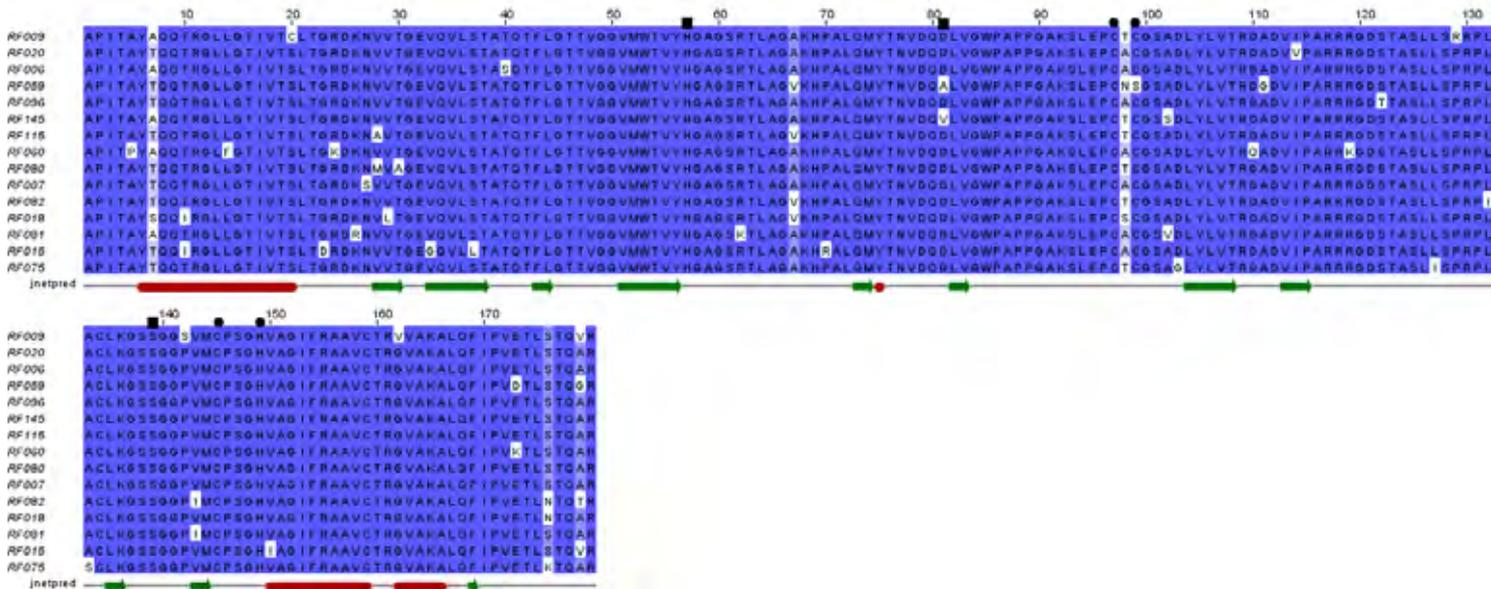


Figura 2

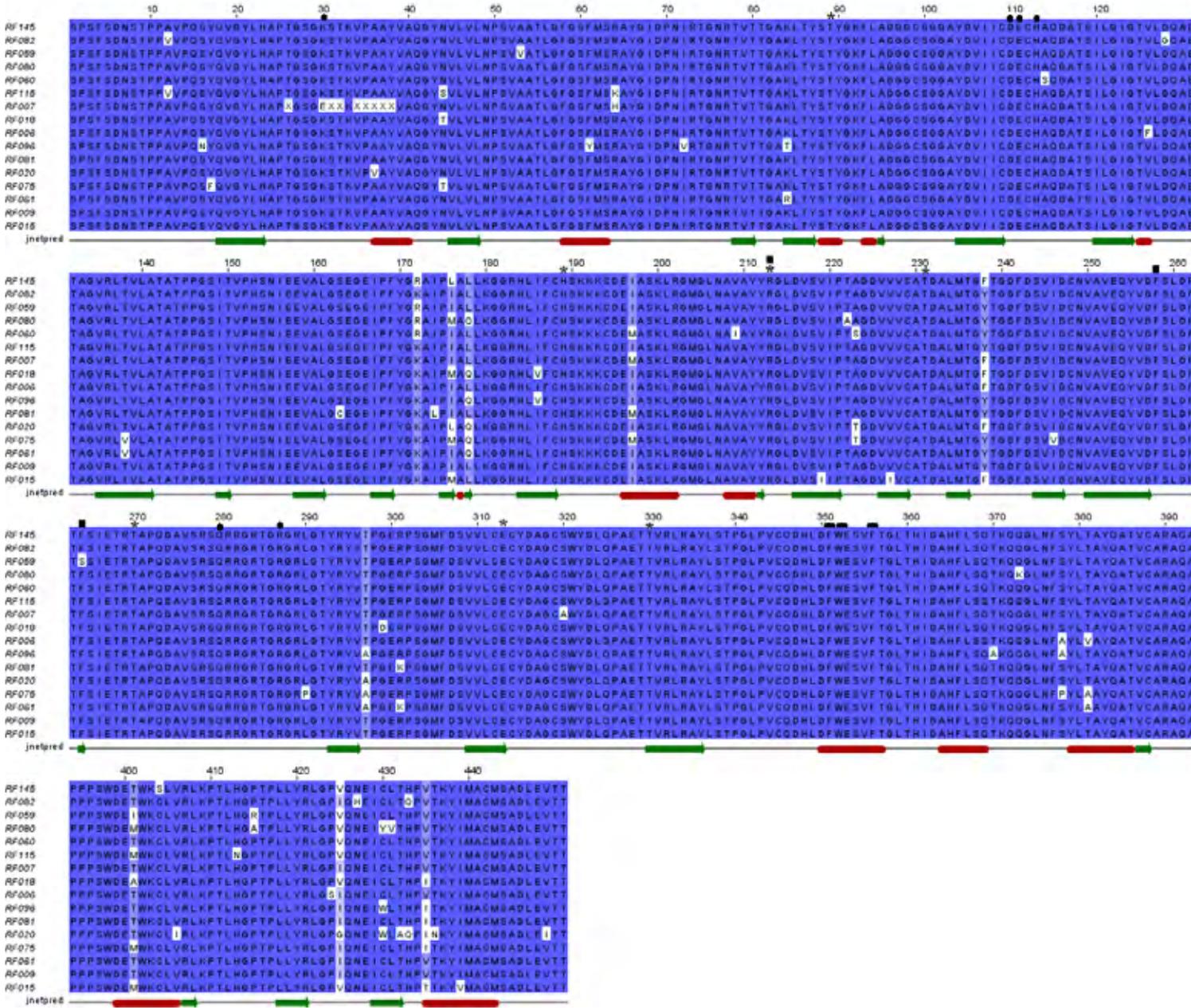


Figura 3

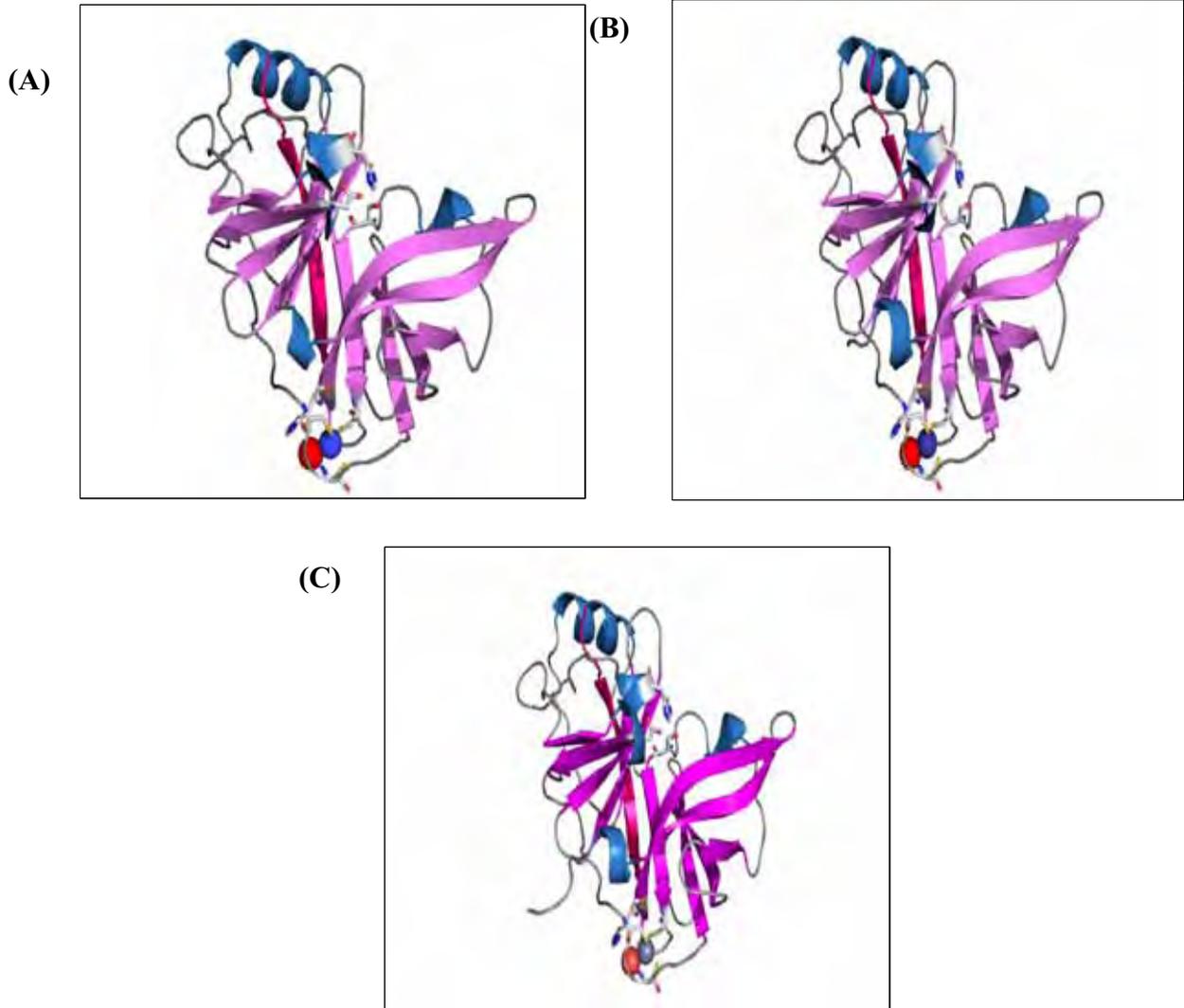


Figura 4

(A)



(B)



(C)

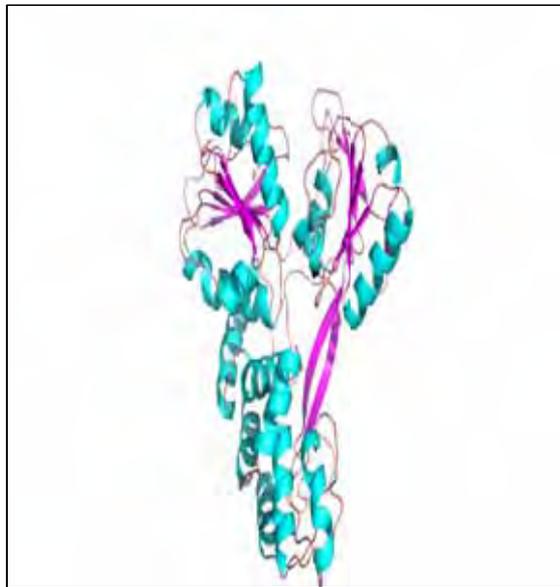


Figura 5

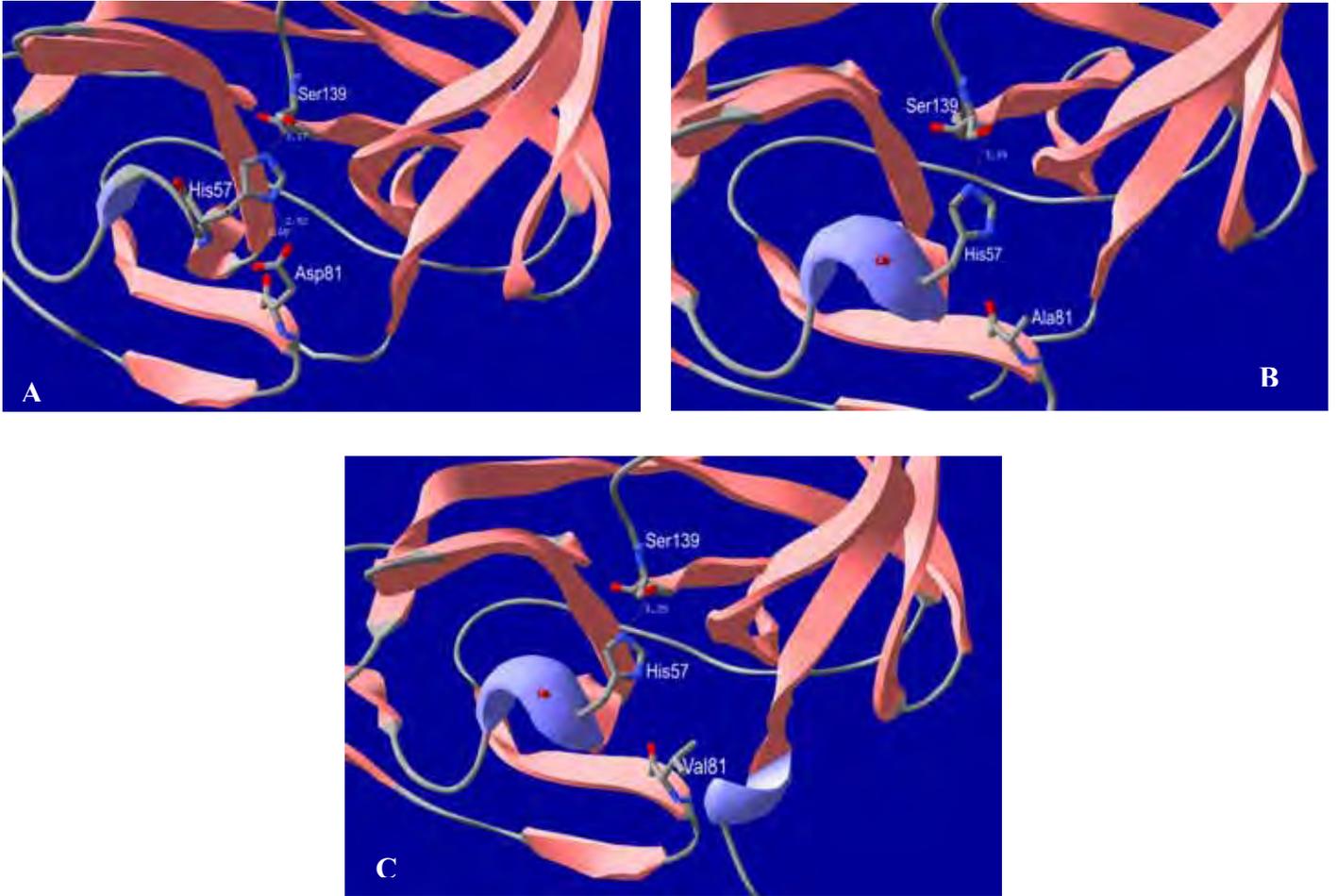


Figura 6

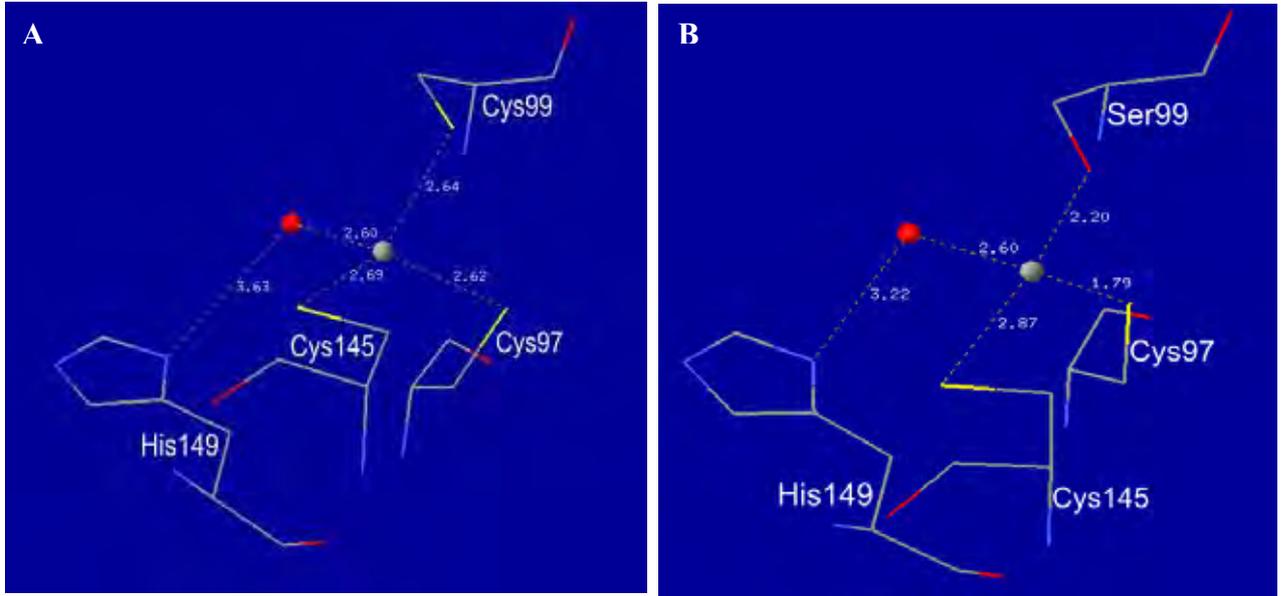


Figura 7

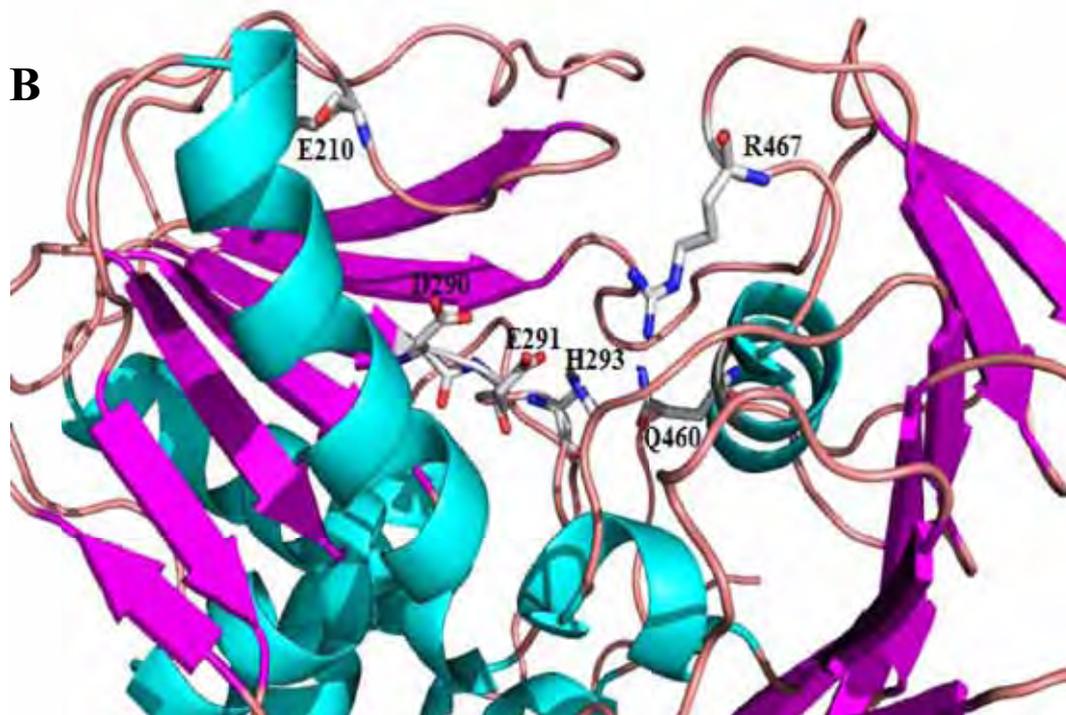
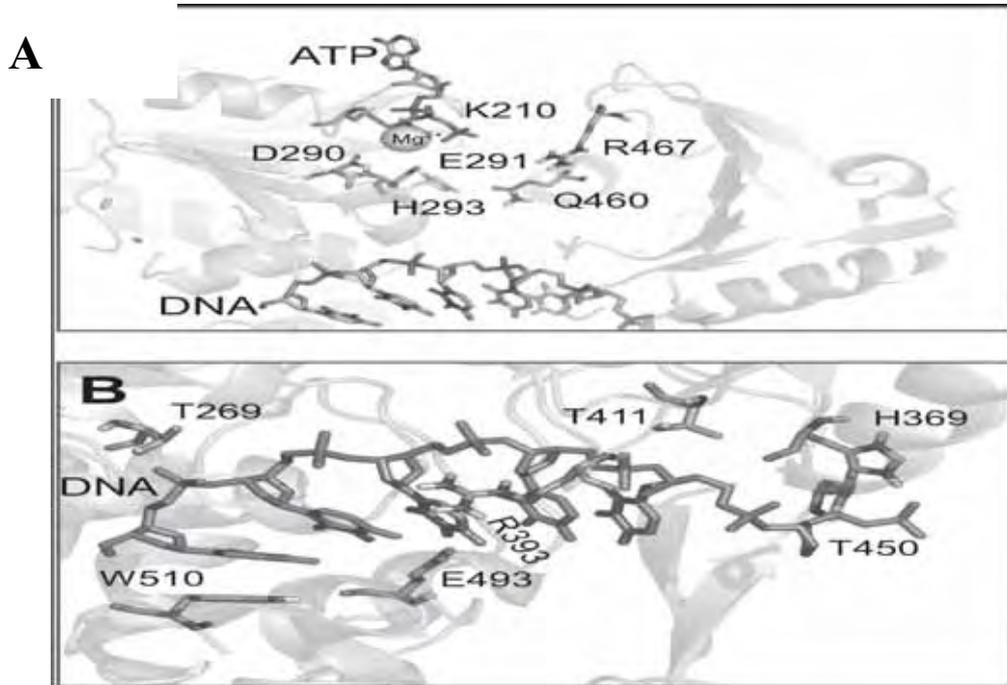
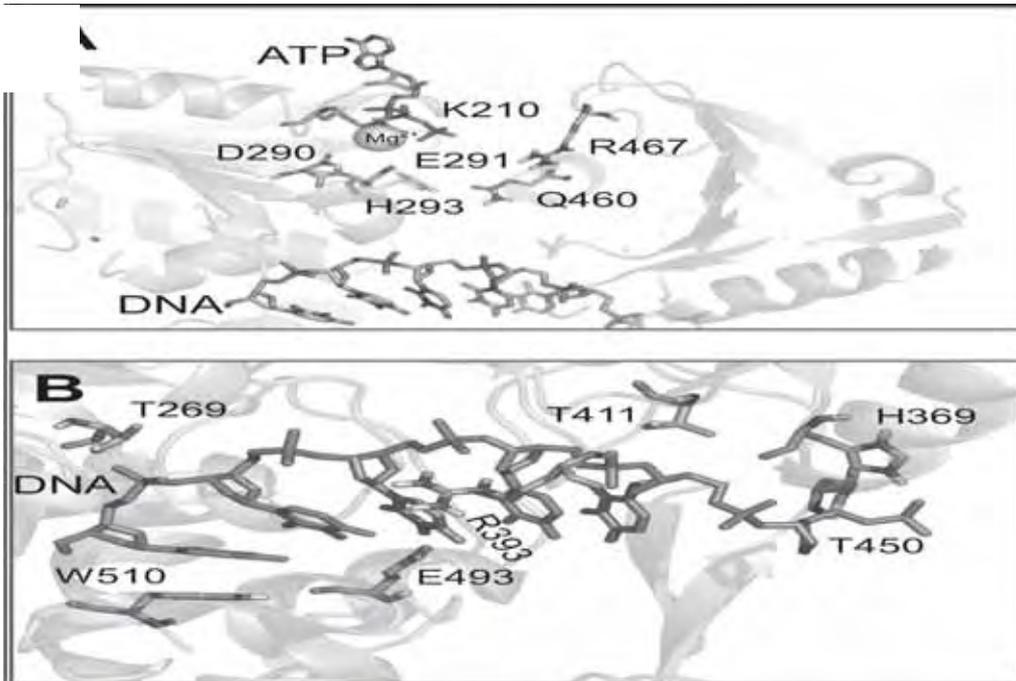
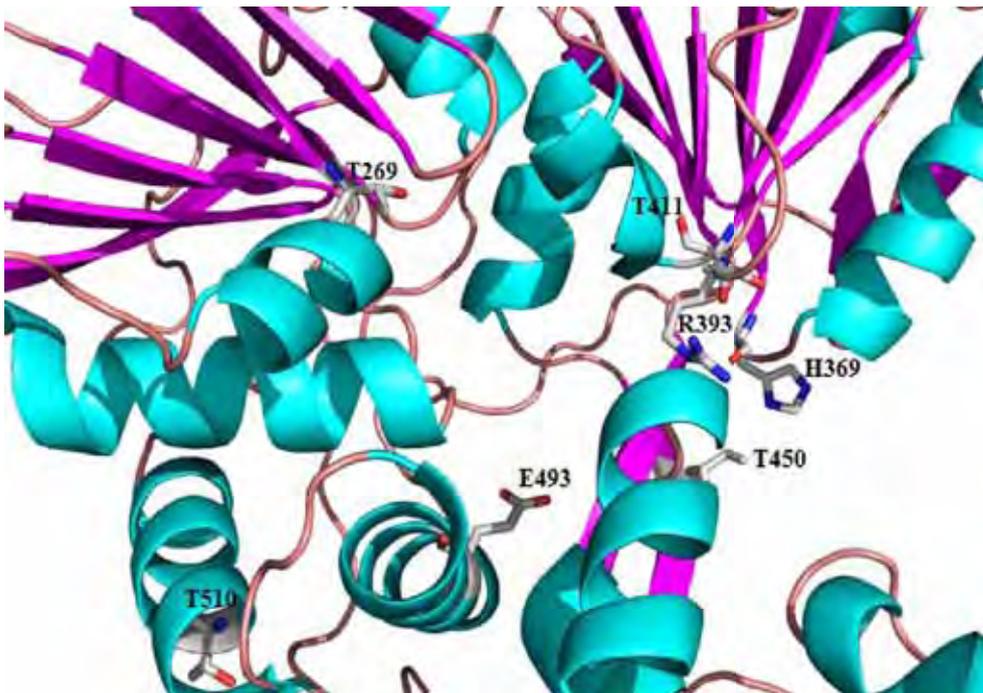


Figura 8

A



B



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identidade e Similaridade entre as seqüências dos moldes e dos modelos.

Tabela 1.

NS3	Molde	Resolução (Å)	Referência	Identidade (%)	Similaridade (%)
Helicase	1CU1	2,50	YAO <i>et al.</i> , 1999	>70	>79
	1DXP	2,40	DI MARCO <i>et al.</i> , 2000	>75	>84
Protease	1DXP	2,40	DI MARCO <i>et al.</i> , 2000	>75	>82

Discussão

A proteína NS3 apresenta dois domínios e é bifuncional. O domínio serino-protease localiza-se na região amino-terminal e o domínio helicase localiza-se na região carboxi-terminal. Com isso, a NS3 apresenta três funções enzimáticas que são; 1) atividade de protease; 2) NTPase e 3) helicase. A função protease relaciona-se a tradução da proteína precursora e as funções NTPase e helicase tem grande participação na replicação do material genético viral (Suzich, 1993; Tai, 1996). Trata-se de uma molécula essencial para o processamento da poliproteína precursora e também para a replicação viral e portanto, um dos principais alvos para o desenvolvimento de drogas antivirais.

Neste trabalho foi identificado por meio da modelagem comparativa, alterações em regiões importantes na estrutura da NS3. Foram avaliadas amostras de soro de 16 pacientes, sendo sete amostras provenientes de pacientes Respondedores (R) e nove amostras provenientes de pacientes Não-Respondedores (NR) ao tratamento com Interferon alfa e ribavirina.

A análise da identidade entre os resíduos da Protease e Helicase mostra que as substituições que ocorrem nos pacientes Respondedores normalmente são para resíduos do mesmo grupo bioquímico (similares) e nos pacientes Não-Respondedores as substituições são para resíduos de grupos bioquímicos diferentes podendo levar a uma mudança na interação com o meio e na afinidade entre a proteína e o ligante.

Foi verificado que tanto o paciente RF059 quanto o paciente RF145 apresentaram a substituição do resíduo Asp81 constituinte da tríade catalítica (His57, Asp81 e Ser139). No caso do paciente RF059, que é Respondedor ao

tratamento com Interferon alfa e ribavirina, a substituição foi para o resíduo Ala81 e no paciente RF145, que é Não-Respondedor a substituição foi para o resíduo Val81.

A Protease do vírus HCV adota um dobramento como das quimiotripsinas que possuem um sítio ativo formado pelos resíduos His57, Ser195 e Asp102. Assim, o mecanismo de ação catalítico das quimiotripsinas pode ser extrapolado para a Protease NS3. Durante a ação catalítica das quimiotripsinas há a formação de um composto intermediário tetraédrico no qual os aminoácidos essenciais para a ação enzimática são a histidina e a serina sendo que esta última desempenha um papel de resíduo reativo que ataca o carbono do grupamento carbonila do peptídeo substrato. Quando o oxigênio da serina ataca o carbono carbonila de uma ligação peptídica, a His57 funciona como uma base geral e abstrai o próton da serina, enquanto o Asp102, que é carregado negativamente, estabiliza a carga negativa que se forma no resíduo de histidina. Isto previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da serina e aumenta sua nucleofilicidade (Voet, *et al.*, 2000).

No caso das duas substituições encontradas o aminoácido Asp81 que é carregado negativamente foi substituído por resíduos apolares (alanina e valina). Com isso, o que se observa é que a função do ácido aspártico em equilibrar as cargas na tríade catalítica durante a catálise é abolida quando trocado pelos resíduos Val81 e Ala81. As trocas também podem influenciar a interação com o substrato, pois os aminoácidos valina e alanina são importantes na promoção de interações hidrofóbicas no interior das estruturas protéicas. O mesmo aminoácido

ácido aspártico foi trocado em um paciente Responder e outro Não-Responder, mas não foi possível correlacionar diretamente esses achados com a resposta ao tratamento pois os medicamentos utilizados, Interferon alfa e ribavirina, pelos pacientes não são inibidores de protease. Em função da atuação dos aminoácidos do sítio ativo na atividade catalítica, é compreensível esperar que dos três resíduos o que seria menos prejudicial para manutenção da atividade protease quando mutado seria o ácido aspártico. Isso porque os aminoácidos da tríade são altamente conservados. Yamada e colaboradores, em 1998, observaram que a troca do aminoácido histidina para leucina na posição 57 (um dos resíduos do sítio ativo) ocasionou a perda da função protease.

A análise das seqüências do fragmento Protease revelaram ainda que o mesmo paciente RF059 (Responder), que já havia apresentado uma substituição no sítio ativo, mostrou a substituição do resíduo Cys99 para Ser99 (ambos polares não-carregados). Neste sítio o íon zinco se une à Cys97, Cys99 e Cys145 e a uma molécula de água através de um resíduo de His149 para constituir uma estrutura em forma de tetraedro. Um possível papel para o íon zinco pode ser induzir estabilidade no sítio ativo através da fita β D2, a qual separa o sítio ativo Ser139 e um dos ligantes do sítio do zinco Cys145. O sítio de ligação ao zinco também está localizado próximo a interface dos dois domínios da protease e pode participar na conformação desses domínios o qual contribuem para a formação do encaixe entre os aminoácidos do sítio ativo e o substrato (Kim *et al.*, 1996).

Tedbury e colaboradores em 2007, confirmaram a participação do íon zinco na atividade autoclivagem NS2/NS3 e demonstraram que os três resíduos de cisteína

(Cys97, Cys99 e Cys145), necessários para a atividade protease da NS3, também são essenciais para a atividade de autoclivagem. O quarto resíduo do sítio do Zinco, His149 não apresentou atuação na autoclivagem. Por outro lado, o resíduo Cys922 foi identificado como um quarto aminoácido necessário à atividade da NS2/NS3, resíduo este que até o momento não se mostrou essencial para atividade protease da NS3. Isto levou os autores a proporem uma possível explanação sobre a sequência de ativação dessas duas proteases. Este modelo prediz que quando o zinco está coordenado ao resíduo Cys922 juntamente com Cys97, Cys99 e Cys145, o precursor está competente para a NS2/NS3 autoclivagem. Quando o quarto resíduo coordenado for a His149 o precursor assume a atividade protease da NS3.

Mutações de ponto nos resíduos Cys97, Cys99, Cys145 e His149 para alanina mostram que a remoção de qualquer um tem um impacto negativo na função protease (Hijikata *et al.*, 1993).

A cisteína é única entre os aminoácidos, pois tem um grupo tiol que pode formar uma ponte dissulfeto com outra cisteína por meio da oxidação dos dois grupos tiol. Assim, apesar do paciente RF059 apresentar a substituição para um resíduo similar (serina), acreditamos que essa troca pode prejudicar a estabilidade da estrutura protéica em razão da perda de uma ponte dissulfeto entre as cisteínas do sítio de ligação ao íon zinco. Também não foi possível correlacionar esse resultado com o tratamento oferecido ao paciente.

Observando-se criteriosamente o paciente Responder RF059 notamos que ele possui substituições nos dois sítios avaliados, tanto na tríade catalítica quanto no sítio de ligação ao íon zinco. Assim, já que não foi possível atribuir essas

trocas a ação dos medicamentos administrados ao pacientes, podemos supor que a sua característica de Responder ao tratamento seja em razão do acúmulo dos prejuízos causados pelas substituições nas duas regiões avaliadas.

A análise das seqüências do fragmento Helicase revelaram a substituição do aminoácido lisina por ácido glutâmico na posição 30 da Helicase ou posição 210 da NS3 no paciente RF007 que é Não-Responder ao tratamento. Este resíduo, assim como os resíduos Arg467, Gln460, His293, Asp290 e Glu291 constitui a região da helicase envolvida na hidrólise do ATP.

A porção C-terminal da proteína não estrutural NS3 corresponde ao domínio helicase o qual possui atividades NTPase (*RNA-stimulated nucleoside triphosphatase*) e RNA helicase. A atividade helicase é indispensável para replicação viral *in vivo*, presumivelmente por linearizar a fita de RNA durante o processo de replicação, permitindo a amplificação do RNA, e conseqüentemente, a síntese da poliproteína precursora viral.

A porção helicase da NS3 é constituída por três domínios. Quando vista como um molécula em forma de Y o domínio 1 N-terminal e o domínio 2 ficam acima do domínio 3 C-terminal. Em duas das estruturas descritas (Kim *et al.*, 1998; Mackintosh *et al.*, 2006), aparecem oligonucleotídeos ligados a helicase na fissura que separa o domínio 3 dos domínios 1 e 2.

Os motivos I, Ia, II, III, IV, V, e VI, localizados nos domínios 1 (região onde ocorre a hidrólise do ATP) e 2 da Helicase constituem o motor que converte a energia química derivada da hidrólise do ATP em uma força química que guia o

movimento da Helicase levando a ruptura dos pares de bases do DNA ou RNA (Frick, 2007).

A atuação da maioria dos resíduos conservados nos motivos I a VI são investigados usando mutações sítios dirigidas (Tai *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Frick *et al.*, 2004a). Mutações nos motivos I a VI normalmente causam impacto na habilidade da proteína em desenrolar o material genético assim como na hidrólise do ATP, mostrando que estas duas atividades agem conjuntamente. Aqui, nós evidenciamos a troca de um resíduo carregado positivamente para um carregado negativamente o que pode causar alterações na distribuição de cargas e na interação entre os aminoácidos e, conseqüentemente, interferir na hidrólise do ATP.

Ainda, no presente trabalho, evidenciamos a substituição do aminoácido triptofano por treonina na posição 330 da Helicase ou posição 510 da NS3 em todos os pacientes avaliados, podendo tratar-se de uma aminoácido característico das formas virais circulantes na nossa região. Este aminoácido, juntamente com os resíduos Thr411, His369, Thr450, Glu493, Thr269 e Arg393, localiza-se na região em o que RNA se liga a Helicase para que ela exerça sua função.

Mutações nos motivos I a VI normalmente causam impacto na habilidade da proteína em desenrolar o material genético assim como na hidrólise do ATP, mostrando que estas duas atividades agem conjuntamente (Tai *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Frick *et al.*, 2004a). Neste estudo foi observada a substituição de um resíduo hidrofóbico (não polar) por um hidrofílico o que leva a perda de

hidrofobicidade na região onde ocorreu a substituição e, conseqüentemente, modifica a interação da proteína com o meio.

Além dos motivos I a VI, os domínios 1 e 2 da helicase apresentam tanto regiões variáveis quanto conservadas. Frick e colaboradores, em 2004, com o objetivo de descobrir as regiões para ligação de possíveis inibidores, examinaram o papel de dois motivos no domínio 2 que são conservados em todos os isolados de HCV, mas não em proteínas relacionadas. A razão para isso é que compostos que se liguem a estes sítios podem não ser tóxicos já que sítios similares não estão presentes em helicases celulares relacionadas. Com isso, o primeiro motivo identificado concentra-se na arginina 393, um resíduo que entra em contato com a estrutura central do ácido nucléico. Quando Arg393 é trocado por alanina, a proteína ainda realiza a hidrólise do ATP estimulada pelo RNA viral mas perde a atividade helicase. Com esta substituição a helicase também liga-se mais fracamente ao RNA tanto na presença quanto ausência do ATP não-hidrolisado, sugerindo que este motivo *Arg-clamp* (Arg393) funcione como um elo que conecta a proteína ao ácido nucléico através do qual ocorre o seu deslocamento (Lam *et al.*, 2003(b)). No presente trabalho, não foram encontradas substituições neste resíduo em nenhum paciente avaliado indicando tratar-se de um resíduo conservado e, portanto, um alvo para o desenvolvimento de inibidores específicos para Helicase.

O segundo motivo exclusivo da helicase do HCV, forma um *loop* que conecta duas folhas- β que se estendem do domínio 2. Esta estrutura é composta pelos aminoácidos Thr430 ao Ala452 e, também, pelo par de resíduos do *loop* de

fenilalanina, Phe438 e Phe444 e está localizada em uma região altamente conservada da extremidade do *loop*. O giro do *loop* é composto dos aminoácidos Phe438 a Phe444 da helicase e, até o momento, sua função têm sido motivo de pesquisas. Kim e colaboradores em 1998, propuseram que este *loop* funcione como uma região de ligação ao RNA simples fita em proteínas. Alternativamente, Yao e colaboradores, em 1997, propuseram que Phe438 e Phe444 podem empacotar-se em uma região hidrofóbica, juntamente com Phe531, Phe536, e Trp532, permitindo que o *loop* tenha um papel mais estrutural. Mutações em outros resíduos fenilalanina que flanqueiam Phe438 e Phe444, demonstram que esse *loop* não está envolvido na ligação ao ácido nucléico. Mais propriamente, Phe438 e Phe444 são importantes tanto para a manutenção da estrutura final da proteína quanto para a modulação das alterações conformacionais que levam a liberação do material genético mediante a ligação do ATP (Lam *et al.*, 2003(b)). Neste trabalho não foram observadas substituições desses resíduos, indicando sua conservação e importância para atividade de linearizar o material genético.

Este estudo teórico, baseado na confiabilidade e na qualidade dos modelos experimentais obtidos aqui, fornece informações sobre o perfil genético do vírus HCV do genótipo 3 especificamente da região codificadora da proteína NS3, permitindo o conhecimento do genoma viral e a identificação de regiões para ligação de possíveis inibidores específicos. Quando identificada uma alteração em uma seqüência viral que justifique a resistência a um dado inibidor, o conhecimento da variabilidade genômica permite o combate a doença por meio do conhecimento e da disponibilidade de ação de outra droga específica para outra

região. Nesse sentido, acreditamos que a terapia futura para a Hepatite C será baseada na utilização de uma combinação de inibidores para diferentes regiões do genoma viral como ocorre com o tratamento do HIV no qual é utilizado um coquetel de inibidores para diferentes proteínas virais.

Este projeto aumenta a certeza de que a modelagem é uma ferramenta útil para a biologia estrutural e funcional, como a aplicação de rotinas de DOCKING usadas com o objetivo de prever a interação sítio-específica com compostos inibidores da Protease.

Com isso, os modelos obtidos fornecerão informações úteis a respeito da proteína NS3 e, também, contribuirão para o desenho de novas drogas anti-virais.

Conclusões

Por meio do presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- 1) A metodologia de modelagem comparativa de seqüências é uma ferramenta útil e confiável para evidenciar alterações na estrutura de proteínas;
- 2) As substituições na tríade catalítica e na região de ligação ao íon zinco da protease quando somadas, podem explicar a resposta ao tratamento;
- 3) Na Helicase, as regiões caracterizadas como possíveis alvos para o desenvolvimento (Arg 213 e *loop* de fenilalanina) de inibidores, por serem exclusivas do vírus HCV, não apresentaram substituições e, portanto, indicam serem altamente conservadas, confirmando serem alvos favoráveis;
- 4) Foram obtidos os perfis genéticos do vírus HCV do genótipo 3, especificamente da região codificadora da proteína NS3;
- 5) Os modelos obtidos aqui contribuem para o desenho de nova drogas anti-virais específicas para o genótipo 3 do vírus HCV;
- 6) As cepas do vírus HCV do genótipo 3 circulantes na região de São José do Rio Preto possuem a substituição do aminoácido triptofano pelo aminoácido treonina na posição 510 da proteína NS3.

Referências Bibliográficas

- ABID, K. et al. An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. **J Hepatol**, v. 42, p. 744-51, 2005.
- AKIRA, S.; HEMMI, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunol lett.**, v. 85, p. 85-95, 2003.
- ALTER, H. J. et al. Hepatitis C in asymptomatic blood donors. **Hepatology**, v. 26, p. 29S-33S, 1997.
- ALTER, M. J. Hepatitis C virus infection in the United States. **J Hepatol**, v. 31, p. 88-91, 1999.
- ANSAR, M. M.; KOOLOOBANDI. A. Prevalence of hepatitis C virus infection in thalassemia and haemodialysis patients in north Iran-Rasht. **J Viral Hepat**, v. 9, p. 390-2, 2002.
- ARMSTRONG, G. L. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. **Ann Intern Med**, v. 144, p. 705-14, 2006.
- ARTSAENKO, O. et al. Abrogation of hepatitis C virus NS3 helicase enzymatic activity by recombinant human antibodies. **J Gen Virol**, v. 84, p. 2323-32, 2003.
- BANERJEE, R.; DASGUPTA, A. Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA. **J Virol**, v. 75, p.1708-21, 2001.
- BARTENSCHLAGER, R. et al. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. **J Virol**, v. 68, p. 5045-55, 1994.
- BARTH, H., A. ULSENHEIMER, et al. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. **Blood**, v. 105, p. 3605-14, 2005.
- BARTOSCH, B. et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. **J Biol Chem**, v. 278, p. 41624-30, 2003.
- BEALES, L. P.; ROWLANDS, D. J.; HOLZENBURG, A. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. **Rna**, v. 7, p. 661-70, 2001.
- BERNSTEIN, D. A.; ZITTEL, M. C. KECK, J. L. High-resolution structure of the E.coli RecQ helicase catalytic capsidial. **EMBO J**, v. 22, p. 4910-21, 2003.
- BERENS, C.; THAIN, A.; SCHROEDER, R. A tetracycline-binding RNA aptamer. **Bioorg Med Chem**, v. 9, p. 2549-56, 2001.

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

BLIGHT, K. J.; RICE, C. M. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. **J Virol**, v. 71, p. 7345-52, 1997.

BOCK, L. C. et al. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. **Nature**, v. 355, p. 564-6, 1992.

BOURLIERE, M. et al. Epidemiological changes in hepatitis C virus genotypes in France: evidence in intravenous drug users. **J Viral Hepat**, v. 9, p. 62-70, 2002.

BRADLEY, D. W. Hepatitis viruses: their role in human cancer. **Proc Assoc Am Physicians**, v. 111, p. 588-93, 1999.

BRASS, V. et al. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem**, v. 277, p. 8130-9, 2002.

BREIMAN, A. et al. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. **J Virol**, v. 79, p. 3969-78, 2005.

BRESSANELLI, S. et al. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. **J Virol**, v. 76, p. 3482-92, 2002.

BRODY, E. N.; GOLD, L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. **J Biotechnol**, v. 74, p. 5-13, 2000.

BRÜNGER, A. T.; X-PLOR Version 3.1: A System for Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, 1992.

BURGSTALLER, P.; KOCHOYAN, M.; FAMULOK, M. Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine-specific RNA aptamers identify base positions required for binding. **Nucleic Acids Res**, v. 23, p. 4769-76, 1995.

BUTCHER, S. J. et al. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. **Nature**, v. 410, p. 235-40, 2001.

CAMPELLO, C. et al. Seroprevalence, viremia and genotype distribution of hepatitis C virus: a community-based population study in northern Italy. **Infection**, v. 30, p. 7-12, 2002.

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

- CARNEIRO, M. A. et al. Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil. **J Med Virol**, v. 79, p. 1325-33, 2007.
- CHANDER, G. et al. Treatment of chronic hepatitis C: a systematic review. **Hepatology**, v. 36, p. S135-44, 2002.
- CHEN, M. et al. Human and murine antibody recognition is focused on the ATPase/helicase, but not the protease domain of the hepatitis C virus nonstructural 3 protein. **Hepatology**, v. 28, p. 219-24, 1998.
- CHERUVATTATH, R. et al. Pegylated interferon and ribavirin failures: is retreatment an option? **Dig Dis Sci**, v. 52, p. 732-6, 2007.
- CHO, H. S. Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. **J Biomol Chem**, v. 273, p. 15045-52, 1998.
- CHOLONGITAS, E.; PAPTAEODORIDIS, G. V. Review article: novel therapeutic options for chronic hepatitis C. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 27, p. 866-84, 2008.
- CHOO, Q.L. et al., Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.
- COCQUEREL, L. et al. Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. **J Virol**, v. 77, p. 1604-9, 2003.
- COLLIER, A. J. et al. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. **Nat Struct Biol**, v. 9, p. 375-80, 2002.
- CORMIER, E. G. et al. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 14067-72, 2004.
- CORMIER, E. G. et al. CD81 is an entry capsid receptor for hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 7270-4, 2004.
- DE FRANCESCO, R. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. **Antiviral Res**, v. 58, p. 1-16, 2003.
- DE FRANCESCO, R. et al. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, v. 436, p. 953-60, 2005.

DOMINGUEZ, A. et al. Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. **J Med Virol**, v. 65, p. 688-93, 2001.

DRUMMER, H. E.; Wilson, K. A.; POUMBOURIOS, P. Determinants of CD81 dimerization and interaction with hepatitis C virus glycoprotein E2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 328, p. 251-7, 2005.

DUSHEIKO, G.; Simmonds, P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. **J Viral Hepat**, v. 1, p. 3-15, 1994.

EATON, B. E. et al. Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers. **Bioorg Med Chem**, v. 5, p. 1087-96, 1997.

ECHOLS, N.; MILBURN, D.; GERSTEIN, M. MolMovDB: analysis and visualization of conformational change and structural flexibility. **Nucleic Acids Res**, v. 31, p. 478-482, 2003.

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

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

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

FLINT, M. et al. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. **J Virol**, v. 80, p. 11331-42, 2006.

FOY, E. et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 2986-91, 2005.

FOY, E. et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. **Science**, v. 300, p. 1145-8, 2003.

FRANCO, S.; CLOTET, B.; MARTINEZ, M. A. et al. A wide range of NS3/4A protease catalytic efficiencies in HCV-infected individuals. **Virus Res**, v. 131, p. 260-70, 2008.

FRANK, C. et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. **Lancet**, v. 355, p. 887-91, 2000.

FRICK, D. N. The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. **Curr Issues Mol Biol**, v. 9, p. 1-20, 2007.

FRICK, D. N. et al. Electrostatic analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase reveals both active and allosteric site locations. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p, 5519-28, 2004.

FUKUDA, K. et al. Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 3685-94, 2000.

FUKUDA, K. et al. An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 325, p. 670-5, 2004.

GAO, L. et al. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. **J Virol**, v. 78, p. 3480-8, 2004.

GEWIRTZ, A. M. Oligonucleotide therapeutics: clothing the emperor. **Curr Opin Mol Ther**, v. 1, p. 297-306, 1999.

GONCALVES, J. et al. Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. **J Biol Chem**, v. 277, p. 32036-45, 2002.

GORBALENYA, A. E.; KOONIN, E. V. One more conserved sequence motif in helicases. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 7734, 1988.

GOZDEK, A. et al. Circular dichroism analysis for multidomain proteins: studies of the irreversible unfolding of Hepatitis C virus helicase. **Acta Biochim Pol**, v. 55, p. 57-66, 2008.

GRAKOU, A. et al. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. **J Virol**, v. 67, p. 2832-43, 1993.

GRIFFIN, S. D. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett**, v. 535, p. 34-8, 2003.

HALL, M. C.; MATSON, S. W. Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. **Mol Microbiol**, v. 34, p. 867-77, 1999.

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

HE, Q. Q. et al. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 N-terminal protein. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi** 32(3): 255-9.(2003).

HEATHCOTE, E. J. Prevention of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, p. S294-302, 2004.

HEO, T. H. et al. Hepatitis C virus E2 links soluble human CD81 and SR-B1 protein. **Virus Res**, v. 121, p. 58-64, 2006.

HIGGINBOTTOM, A. et al. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. **J Virol**, v. 74, p. 3642-9, 2000.

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

HINRICHSEN, H. et al. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. **Gastroenterology**, v. 127, p. 1347-55, 2004.

HOOFT, R. et al. Errors in protein structures. **Nature**, v.381, p.272, 1996.

HOURIOUX, C. et al. The genotype 3-specific hepatitis C virus capsidial protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. **Gut**, v. 56, p. 1302-8, 2007.

HOWE, A. Y. et al. A novel recombinant single-chain hepatitis C NS3-NS4A protein with improved helicase activity. **Protein Sci**, v. 8, p. 1332-41, 1999.

HWANG, J. et al. The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 279, p. 557-62, 2000.

KAPADIA, S. B. et al. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. **J Virol**, v. 81, p. 374-83, 2007.

KATO, N. et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, p. 9524-8, 1990.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta Med Okayama**, v. 55, p. 133-59, 2001.

KAWAI, K. et al. Pathophysiological characteristics and responsiveness to neurohormonal antagonism in idiopathic dilated cardiomyopathy patients with antihepatitis C virus antibody. **Int Heart J**, v. 46, p. 407-17, 2005.

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

KIM, J. L. et al. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*, v. 6, p. 89-100, 1998.

KIM, J. W. et al. Structurally conserved amino Acid w501 is required for RNA helicase activity but is not essential for DNA helicase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J Virol*, v. 77, p. 571-82, 2003.

KOLYKHALOV, A. A.; FEINSTONE, S. M.; RICE, C.M. et al. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, v. 70, p. 3363-71, 1996.

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

KOUTSOUDAKIS, G. et al. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol*, v. 81, p. 588-98, 2007.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation and fusion, *Cell*, v. 8, p. 717-25, 2002.

LAM, A. M. et al. Hepatitis C virus NS3 ATPases/helicases from different genotypes exhibit variations in enzymatic properties. *J Virol*, v. 77, p. 3950-61, 2003 (a).

LAM, A. M.; Keeney, D.; FRICK, D. M. et al. Two novel conserved motifs in the hepatitis C virus NS3 protein critical for helicase action. *J Biol Chem*, v. 278, p. 44514-24, 2003 (b).

LAMARRE, D., P. C. Anderson, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, v. 426, p. 186-9, 2003

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK v.3.0 – Program to check the stereochemistry quality of protein structures – Operating instructions, 1994.

LAVIE, M.; Goffard, A.; DUBUISSON, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol*, v. 9, p. 71-86, 2007.

LAW, M. G. et al. Modelling hepatitis C virus incidence, prevalence and long-term sequelae in Australia, 2001. *Int J Epidemiol*, v. 32, p. 717-24, 2003

LE TINEVEZ, R.; Mishra, R. K.; TOULME, J. J. Selective inhibition of cell-free translation by oligonucleotides targeted to a mRNA hairpin structure. **Nucleic Acids Res**, v. 26, p. 2273-8, 1998.

LESBURG, C. A. et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. **Nat Struct Biol**, v. 6, p. 937-43, 1999.

LEVY, S.; Todd, S. C.; MAECHER, H. T. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 89-109, 1998.

LI, K., et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 2992-7, 2005.

LI, X. D. et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 17717-22, 2005.

LIN, C. et al. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. **J Virol**, v. 68, p. 5063-73, 1994.

LIN, C. et al. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. **J Biol Chem**, v. 279, p. 17508-14, 2004.

LINDENBACH, B. D. et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 3805-9, 2006.

LLINAS-BRUNET, M. et al. Studies on the C-terminal of hexapeptide inhibitors of the hepatitis C virus serine protease. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 8, p. 2719-24, 1998.

LLINAS-BRUNET, M. et al. Highly potent and selective peptide-based inhibitors of the hepatitis C virus serine protease: towards smaller inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 10, p. 2267-70, 2000

LOHMANN, V. et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**, v. 285, p. 110-3, 1999.

LONARDO, A. et al. Hepatitis C and steatosis: a reappraisal. **J Viral Hepat**, v. 13, p. 73-80, 2006.

LOZACH, P. Y. et al. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. **J Biol Chem**, v. 279, p. 32035-45, 2004.

LU, L. et al. . Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 2260-6, 2004.

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

LUPOLD, S. E. et al. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. **Cancer Res**, v. 62, p. 4029-33, 2002

LUTHY, R.; BOWIE, J. U. & EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v.356, p.383-385, 1992.

MACKINTOSH, S. G. et al. Structural and biological identification of residues on the surface of NS3 helicase required for optimal replication of the hepatitis C virus. **J Biol Chem**, v. 281, p. 3528-35, 2006.

MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol**, v. 66, p. 3225-9, 1992.

MCWHIRTER, S. M; TENOEVER, B. R. MANIATIS, T. Connecting mitochondria and innate immunity. **Cell**, v. 122, p. 645-647, 2005.

MEE, C. J. et al. Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. **J Virol**, v. 82, p. 461-70, 2008.

MELLOR, J. et al. Survey of type 6 group variants of hepatitis C in Southeast Asia by using a capsidial-based genotyping assay. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 417-23, 1996.

MELLO, I. M. V. G. D. C. Evidências moleculares da transmissão horizontal do vírus da hepatite C (HCV) em cônjuges. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2006.

MEOLA, A. et al. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. **J Virol**, v. 74, p. 5933-8, 2000.

MONAZAHIAN, M. et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. **J Med Virol**, v. 57, p. 223-9, 1999.

- MONDELLI, M. U. et al. Hepatitis C virus (HCV) capsidial serotypes in chronic HCV infection. **J Clin Microbiol**, v. 32, p. 2523-7, 1994.
- MONTALTO, G. et al. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. **Ann N Y Acad Sci.**, V. 963, P. 13-20, 2002.
- MORADPOUR, D. et al. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. **J Virol**, v. 78, p. 13278-84, 2004.
- NAKAI, K. et al. Oligomerization of hepatitis C virus capsidial protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. **J Virol**, v. 80, p. 11265-73, 2006.
- NISHIKAWA, F. et al. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. **Nucleic Acids Res**, v. 31, p. 1935-43, 2003.
- NISHIKAWA, F. et al. In vitro selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. **Oligonucleotides**, v. 14, p. 114-29. 2004.
- OKUDA, M. et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus capsidial protein. **Gastroenterology**, v. 122, p. 366-75, 2002.
- OP DE BEECK, A. et al. The Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2 Play a Major Role in Heterodimerization. **J. Biol. Chem**, v. 275, p. 31428-31437, 2000.
- PARANA, R. et al. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arq Gastroenterol**, v. 37, p. 213-6, 2000.
- PAVLOVIC, D. et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 6104-8, 2003.
- PAWLITSKY, J. M. Diagnostic testing in hepatitis C virus infection: viral kinetics and genomics. **Semin Liver Dis**, **23 Suppl 1**, p. 3-11, 2003.
- PENIN, F. et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J. Biol Chem**. v. 279, p. 40835- 43, 2004.
- PETRACCA, R. et al. Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. **J Virol**, v. 74, p. 4824-30, 2000.

- PILERI, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, p. 938-41, 1998.
- PILEUR, F. et al. Selective inhibitory DNA aptamers of the human RNase H1. **Nucleic Acids Res**, v. 31, p. 5776-88, 2003.
- POHLMANN, S. et al. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. **J Virol**, v. 77, p. 4070-80, 2003.
- PONTISSO, P., et al. Hepatitis C virus genotypes HCV-1a and HCV-1b: the clinical point of view. **J Infect Dis**, v. 171, p. 760, 1995.
- PRABHU, R. et al. Inhibition of hepatitis C virus nonstructural protein, helicase activity, and viral replication by a recombinant human antibody clone. **Am J Pathol**, v. 165, p. 1163-73, 2004.
- PRATI, D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. **J Hepatol**, v. 45, p. 907-16, 2006.
- PRESCOTT, L. E. et al. Detection and clinical features of hepatitis C virus type 6 infections in blood donors from Hong Kong. **J Med Virol**, v. 50, p. 168-75, 1996.
- RAMIA, S. et al. Hepatitis-C-virus genotypes and hepatitis-G-virus infection in Lebanese thalassaemics. **Ann Trop Med Parasitol**, v.96, p. 197-202, 2002.
- REISER, M. et al. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. **Hepatology**, v. 41, p. 832-5, 2005.
- RIGOTTI, A.; MIETTINEN, H. E.; KRIEGER, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. **Endocr Rev**, v. 24, p. 357-87, 2003.
- ROBERTS, S. K.; KEMP, W. Hepatocellular carcinoma in an Australian tertiary referral hospital 1975-2002: change in epidemiology and clinical presentation. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, p. 191-6, 2007.
- ROCCASECCA, R. et al. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. **J Virol**, v. 77, p. 1856-67, 2003.
- SAKAI, A. et al. The p7 polypeptide of hepatitis virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 11646- 51, 2003.

- SAGNELLI, E. et al. The importance of HCV on the burden of chronic liver disease in Italy: a multicenter prevalence study of 9,997 cases. **J Med Virol**, v. 75, p. 522-7, 2005.
- SAKAMURO, D.; FURUKAWA, T.; TAKEGAMI, T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. **J Virol**, v. 69, p. 3893-6, 1995.
- SCARSELLI, E. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **Embo J**, v. 21, p. 5017-25, 2002.
- SCHWER, B. et al. Targeting of hepatitis C virus capsidial protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. **J Virol**, v. 78, p. 7958-68, 2004.
- SCHWIETERS, C. D. et al. The XPLOR-NIH NMR Molecular Structure Determination Package. **J. Magn. Res**, v.160, p.66-74, 2003.
- SELBY, M. J. et al. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. **J Gen Virol**, v. 74, p. 1103-13, 1993.
- SETH, P. P. et al. SAR by MS: discovery of a new class of RNA-binding small molecules for the hepatitis C virus: internal ribosome entry site IIA subdomain. **J Med Chem**, v. 48, p. 7099-102, 2005.
- SHAW, M. L. et al. Characterisation of the differences between hepatitis C virus genotype 3 and 1 glycoproteins. **J Med Virol**, v. 70, p. 361-72, 2003
- SHEPARD, C. W.; Finelli, L.; ALTER, M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 558-67, 2005.
- SHIFFMAN, M. L. et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1015-23, 2004.
- SHIMOTOHNO, K. Hepatitis C and its pathogenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 10, p. 233-40, 2000.
- SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, p. 962-73, 2005.
- SIMMONDS, P. et al. Epidemiological, clinical and therapeutic association of hepatitis C types in western European patients. **J hepatol**, v. 5, p. 517-524, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA
<<http://www.sbhepatologia.org.br>>.

SOULTANAS, P. et al. DNA binding mediates conformational changes and metal ion coordination in the active site of PcrA helicase. **J. Mol Biol**, v. 290, p. 137-148, 1999.

SPAHN, C. M. et al. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. **Science**, v. 291, p. 1959-62, 2001.

SULLIVAN, D. E. et al. Construction and characterization of an intracellular single-chain human antibody to hepatitis C virus non-structural 3 protein. **J Hepatol**, v. 37, p. 660-8, 2002.

SUN, C. A. et al. Transmission of hepatitis C virus in Taiwan: prevalence and risk factors based on a nationwide survey. **J Med Virol**, v. 59, p. 290-6, 1999.

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

SUZUKI, R. et al. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus capsidial protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. **Virology**, v. 280, p. 301-9, 2001.

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

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

TAI, C. L. et al. Structure-based mutational analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase. **J Virol**, v. 75, p. 8289-97, 2001.

TAKAMIZAWA, A. et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **J Virol**, v. 65, p. 1105-13, 1991.

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

TANAKA, Y. et al. Selective binding of hepatitis C virus capsidial protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. **Virology**, v. 270, p. 229-36, 2000.

TEDBURY, P. R.; HARRIS, M. Characterisation of the role of zinc ion in the hepatitis C NS2/3 auto-cleavage and NS3 protease activities. *J Mol Biol*, v. 366, p. 1652-60, 2007.

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

TERRAULT, N. A. Hepatitis C virus and liver transplantation. *Semin Gastrointest Dis*, v. 11, p. 96-114, 2000.

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

THIBEAULT, D. et al. Sensitivity of NS3 serine proteases from hepatitis C virus genotypes 2 and 3 to the inhibitor BILN 2061. *J Virol*, v. 78, p. 7352-9, 2004.

THOMSSSEN, R. et al. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol*, v. 181, p. 293-300, 1992.

TOLEDO JR, A. C et al. Seroprevalence of Hepatitis B and C in Brazilian Army Conscripts in 2002. A Cross-Sectional Study. *Brazilian J Infect Dis*, v. 9, p. 374-383, 2005.

TOMEI, L. et al. A central hydrophobic domain of the hepatitis C virus NS4A protein is necessary and sufficient for the activation of the NS3 protease. *J Gen Virol*, v. 77, p. 1065-70, 1996.

TROZZI, C. et al. In vitro selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor. *J Virol*, v. 77, p. 3669-79, 2003.

TSUKIYAMA-KOHARA, K. et al. Antigenicities of Group I and II hepatitis C virus polypeptides--molecular basis of diagnosis. *Virology*, v. 192, p. 430-7, 1993.

UMEHARA, T. et al. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem*, v. 137, p. 339-47, 2005.

VAN KOOYK, Y.; Geijtenbeek, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, v. 3, p. 697-709, 2003.

VELANKAR, S. S. et al., Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanisms. *Cell*, v. 97, p. 75-84, 1999.

Vertex Pharmaceuticals reports that oral hepatitis C protease inhibitor VX-950 dramatically reduces viral levels in phase 1b clinical study. <<http://www.vrtx.com> (2005)>.

VOET, D; VOET, G J; PRATT, C W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artes Médicas; 2000. 931 p.

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

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

WANG, C.; SARNOW, P.; SIDDIQUI, A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. **J Virol**, v. 67, p. 3338-44, 1993.

WEINER, A. J. et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. **Virology**, v. 180, p. 842-8, 1991.

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

World Health Organization. <<http://www.who.int/en/>>.

YAGNIK, A. T. et al. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. **Proteins**, v. 40, p. 355-66, 2000.

YAMADA, N. et al, Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. **Virology**, v. 223, p.255-261, 1996.

YANAGI, M. et al. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, p. 8738-43, 1997.

YANAGI, M. et al. Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo. **Virology**, v. 244, p. 161-72, 1998.

YANAGI, M. et al. Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. **Virology**, v. 262, p. 250-63, 1999.

YANG, S. H. et al. Internal cleavage of hepatitis C virus NS3 protein is dependent on the activity of NS34A protease. **Virology**, v. 268, p. 132-40, 2000.

YAO, N. et al. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. **Nat Struct Biol**, v. 4, p. 463-7, 1997.

YAO, N. et al. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. **Structure**, v. 7, p. 1353-63, 1999.

YASUI, K. et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus capsidial protein. **J Virol**, v. 72, p. 6048-55, 1998.

ZEMEL, R. et al. Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. **J Viral Hepat**, v. 8, p. 96-102, 2001.

ZHENG, A. et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional capsidialceptors for hepatitis C virus. **J Virol**, v. 81, p. 12465-71, 2007.

Resumo

A proteína NS3 apresenta dois domínios e é bifuncional. Apresenta três funções enzimáticas que são; 1) atividade de protease; 2) NTPase e 3) helicase. A função protease relaciona-se a tradução da proteína precursora e as funções NTPase e helicase tem grande participação na replicação do material genético viral. Trata-se de uma molécula essencial para o processamento da poliproteína precursora e também para a replicação viral e portanto, um dos principais alvos para o desenvolvimento de drogas antivirais. No domínio Protease foram evidenciadas substituições na tríade catalítica e na região de ligação ao íon zinco nos pacientes avaliados. Estas substituições, quando somadas podem explicar a resposta ao tratamento. Também foram visualizadas alterações na porção Helicase da NS3. As substituições ocorreram nos sítios de ligação ao ATP e ao RNA. Outros resíduos da Helicase relevantes para o desenvolvimento de inibidores, como R2133 e F258 e F264 não apresentaram substituições, evidenciando tratarem-se de aminoácidos conservados nessa região. Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem informações sobre o perfil genético do vírus HCV do genótipo 3 especificamente da região codificadora da proteína NS3, permitindo o conhecimento do genoma viral e a identificação de regiões para ligação de possíveis inibidores. Este projeto certifica que a modelagem é uma ferramenta útil para a biologia estrutural e funcional, e que os modelos obtidos aqui contribuem para o desenho de novas drogas anti-virais específicas para o genótipo 3 do vírus HCV.

Palavras-chave: Hepatitis C virus, Protease NS3 HCV, Helicase NS3 HCV, modelagem comparativa.

Abstract

The NS3 protein has two domains and is bifunctional. It presents three functions: 1) protease activity, 2) NTPase and 3) helicase. The protease function is related to the translation of the poliprotein precursor and functions NTPase and helicase has great participation in the replication of the viral genetic material. So, The NS3 is considered the major target for the development of antiviral drugs. In the Protease portion substitutions were evidenced in catalytic triad and the zinc ion binding sites, in the patients evaluated. These substitutions, when added up can explain the response to treatment. Also were observed changes in Helicase portion of NS3. The substitutions took place on ATP and RNA binding sites. Other residues of Helicase relevant to the development of inhibitors, as R2133 and F258 and F264, showed no substitutions, highlighting the great conservation of amino acids in this region. The results obtained in this work provide information on the genetic profile of the HCV virus genotype 3, specifically the region of NS3 protein, allowing the knowledge of the viral genome and the identification of regions for possible connection of inhibitors. This project certifies that the modeling is a useful tool for structural biology and functional, and that the models obtained here contribute to the design of new anti-viral drugs specific to the genotype 3 of HCV virus

Keywords: Hepatitis C virus, Protease NS3 HCV, Helicase NS3 HCV,