



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Alterações Transcricionais Induzidas Pelo Vírus Da Hepatite
Delta Numa Perspectiva Genómica

Inês Margarida Bernardo Brito

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E
INTERNACIONAL**

(DEZEMBRO, 2018)



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Alterações Transcricionais Induzidas Pelo Vírus Da Hepatite
Delta Numa Perspectiva Genómica

Autor: Inês Margarida Bernardo Brito

Orientador: João Paulo Tavanez da Silva Fernandes

Co-orientador: Celso Vladimiro Ferreira de Abreu Cunha

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de diversas pessoas, pelo que tenho a agradecer:

Ao João Tavanez, por me ter ensinado tanto ao longo deste ano, deixando-me com a certeza do meu gosto por fazer ciência. Agradeço ainda a sua orientação e a disponibilidade que sempre demonstrou durante este ano.

Ao Celso Cunha, por me ter recebido no seu laboratório assim como por todo o apoio que obtive da sua parte e pela sua disponibilidade.

Ao Juan Valcárcel e à Estefania Mancini do *Centre for Genomic Regulation*, pela ajuda prestada na realização da sequenciação do RNA, e subsequente análise.

À minha mãe e ao meu pai por acreditarem sempre em mim, apoiando-me incondicionalmente.

Por último, ao Carlos, por todo o apoio e ajuda que me deu durante este ano, sem os quais este teria sido um ano mais comprido.

Resumo

O vírus da hepatite delta é o mais pequeno vírus conhecido dos que infectam o ser humano. Possui um genoma de RNA, numa molécula circular com cerca de 1700 nucleótidos. A partícula viral é composta por RNA genómico e por ambas as formas do antigénio delta (codificadas por uma única grelha de leitura aberta), rodeados por um invólucro formado por antigénios de superfície do vírus da hepatite B. Devido a essa relação entre os dois vírus, o vírus da hepatite delta apenas infecta indivíduos que se encontrem infectados pelo vírus da hepatite B. Apesar disto, é capaz de induzir a forma mais agressiva de hepatite viral, estimando-se que afecte cerca de 20 milhões de pessoas globalmente.

Apesar das células do mesmo organismo partilharem o seu genoma, essas possuem diferentes fenótipos e funções, muitas vezes devido a diferenças transcriptómicas. Uma das formas de analisar essas diferenças é utilizando a técnica de RNA-seq que permite, através de *next generation sequencing* aplicada a DNA complementar, perceber como se encontra a população de RNAs de um conjunto de células num determinado momento ou condição.

Neste trabalho estabeleceu-se um modelo de infecção pelo vírus da hepatite delta, através da transfecção de um plasmídeo (pSVL(D3)) que contém cDNA do genoma do HDV, em células de uma linha celular (HuH-7) derivada de carcinoma hepatocelular humano. A partir daí, procedeu-se à extracção do RNA total e à sequenciação do mesmo. Diversos genes foram identificados pelo RNA-seq como diferencialmente expressos na presença de HDV. Um dos genes identificado como sobre-expresso com a infecção por HDV foi o gene *c-fos*. Este integra o factor de transcrição AP-1, encontrando-se envolvido em diversas vias de sinalização celular e interagindo com vários outros genes.

Uma vez que o factor AP-1 é um dímero constituído por proteínas de diferentes famílias, foi analisada, por PCR, a expressão de outros genes da família FOS e da família JUN, concluindo-se que apenas o gene *c-fos* se encontrava alterado com a presença de HDV. Também a ciclina D1 (um dos genes regulados por *c-fos/AP-1*) apresentou-se mais expressa após a infecção por HDV.

Em conclusão, este trabalho permitiu obter uma visão das alterações transcricionais globais induzidas pela infecção do vírus da hepatite delta. Em particular, permitiu identificar um aumento de expressão do proto-oncogene *c-fos*, e de genes por si regulados, sugerindo que o gene *c-fos* pode desempenhar um papel importante no efeito patogénico do HDV. Estes resultados poderão contribuir para uma melhor compreensão do processo de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular desencadeado pelo vírus da hepatite delta.

Palavras-chave: vírus da hepatite delta, RNA-seq, *c-fos*, AP-1, carcinoma hepatocelular

Abstract

The hepatitis delta virus is the smallest virus known to infect humans. It has an RNA genome, in a circular molecule with about 1700 nucleotides. The viral particle is composed of genomic RNA and both forms of delta antigen (encoded by a single open reading frame), surrounded by an envelope formed by surface antigens of the hepatitis B virus. Due to the relationship between both viruses, the hepatitis delta virus only infects individuals who are infected with the hepatitis B virus. Despite this, it is able to induce the most aggressive form of viral hepatitis and is estimated to affect about 20 million people globally.

Although the cells of the same organism share their genomes, they have different phenotypes and functions, often due to transcriptomic differences. One way to analyze these differences is by using the RNA-seq technique which allows, through next generation sequencing applied to complementary DNA, to perceive how the population of RNAs from a set of cells is found at a given time or condition.

In this work we established a model of infection by the hepatitis delta virus, transfecting a plasmid (pSVL (D3)) containing cDNA of HDV genome, into cells of a cell line (HuH-7) derived from human hepatocellular carcinoma. Afterwards, the total RNA was extracted and sequenced. Several genes were identified through RNA-seq as differentially expressed on the presence of HDV. One of the genes identified as over-expressed with the infection of HDV was *c-fos*. It integrates the AP-1 transcription factor, is involved in several cell pathways, and interacts with several other genes.

Since the AP-1 factor is a dimer made up of proteins from different families, other genes from the FOS family and from the JUN family expression were analyzed by PCR, concluding that only *c-fos* was altered with the presence of HDV. Also cyclin D1 (one of the *c-fos* / AP-1 regulated genes) was most expressed after HDV infection.

In conclusion, this work provided an overview of the global transcriptional changes induced by hepatitis delta virus infection. In particular, it identified an overexpression of the *c-fos* proto-oncogene, and genes regulated by it, suggesting that the *c-fos* gene may play an important role in the pathogenic effect of HDV. These results may contribute to a better understanding of the development process of hepatocellular carcinoma caused by hepatitis delta virus.

Keywords: hepatitis delta virus, RNA-seq, *c-fos*, AP-1, hepatocellular carcinoma

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
1. Introdução	1
1.1 O vírus da hepatite delta.....	2
1.1.1 Entrada do HDV nas células	4
1.1.2 Replicação do HDV	5
1.1.3 Epidemiologia e tratamentos.....	8
1.2 O HDV e o Carcinoma Hepatocelular	11
1.2.1 Alterações de expressão génica associadas à infecção por HDV	12
1.3 Sequenciação de RNA	13
1.4 Objectivo principal	15
1.4.1 Objectivos específicos	15
2. Material e Métodos	16
2.1 Linha celular	17
2.2 Transformação de bactérias com plasmídeos	17
2.3 Transfecção de células HuH-7 com plasmídeos de HDV.....	18
2.4 Extracção de RNA	18
2.5 Transcrição reversa	19
2.6 Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR)	20
2.7 Preparação de extractos proteicos	22
2.8 <i>Western Blot</i>	22
2.9 Sequenciação de RNA (RNA-seq)	22
2.10 small interference RNA (siRNA)	23
3. Resultados	24
3.1 Estabelecimento de modelo de infecção por HDV em células HuH-7	25
3.2 Sequenciação de RNA	26
3.2.1 Validação do RNA seq	33

3.3 Alterações na expressão dos componentes do factor AP-1 induzidas pela infecção por HDV	36
3.3.1 Aumento da expressão de c-fos induzida por HDV conduz a um aumento da expressão da ciclina D1	40
4. Discussão e Conclusões	44
5. Referências Bibliográficas	56
Anexos	74
Anexo I	74

Índice de Figuras

Figura 1.1: Representação esquemática do virião do HDV.....	3
Figura 1.2: Estrutura dos antigénios de superfície do HBV.....	4
Figura 1.3: Mecanismo de círculo rolante	6
Figura 1.4: Domínios funcionais do S-HDAg e L-HDAg.....	7
Figura 1.5: Prevalência do HDV e distribuição geográfica dos genótipos.....	9
Figura 1.6: Representação esquemática de uma experiência de RNA-seq típica.....	14
Figura 3.1: Expressão do RNA genómico do HDV em células transfectadas com pSVL(D3).....	25
Figura 3.2: Expressão de ambas as formas do antigénio delta em células HuH-7 após transfecção com pSVL(D3)	26
Figura 3.3: Conteúdo GC de cada <i>read</i> por amostra sequenciada	27
Figura 3.4: Percentagem de <i>reads</i> com diferentes tipos de alinhamentos	28
Figura 3.5: Níveis de expressão dos transcritos de genes seleccionados com logFC positivo....	34
Figura 3.6: Níveis de expressão dos transcritos de genes seleccionados com logFC negativo ..	35
Figura 3.7: Níveis de expressão dos transcritos dos genes da família FOS.....	37
Figura 3.8: Níveis de expressão dos transcritos dos genes da família JUN.....	38
Figura 3.9: Níveis de expressão de c-fos após transfecção com pDL481.....	39
Figura 3.10: Níveis de expressão de c-fos após transfecção com pDL542.....	39
Figura 3.11: Níveis de expressão de c-fos após transfecção com pSVL-S-HDAg e pSVL-L-HDAg	40
Figura 3.12: Níveis de expressão do transcrito de ciclina D1 após transfecção com pSVL(D3)..	41
Figura 3.13: Níveis de expressão de c-fos após a transfecção com siRNAs de c-fos	42
Figura 3.14: Níveis de expressão de ciclina D1 após a transfecção com siRNAs de c-fos.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Condições utilizadas nas PCRs efectuadas	20
Tabela 2.2: <i>Primers</i> utilizados nas PCRs realizadas	21
Tabela 3.1: Resultados do RNA-seq, com <i>p-value</i> inferior a 0,1.....	29
Tabela 3.2: Termos <i>Gene Ontology</i> representados no conjunto de genes resultantes do RNA-seq	32

Lista de abreviaturas

AP-1 – proteína activadora 1
ATF – factor de transcrição activador
CCD – domínio super-enrolado
CCND1 – ciclina D1
cdk – cinase dependente de ciclinas
cDNA – DNA complementar
chr – cromossoma
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNMT3b – DNA metiltransferase 3b
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ex. – exão
FBS – soro fetal bovino
FDR – taxa de descobertas falsas
Fwd – *forward*
GC – conteúdo de guaninas e citosinas
GPC5 – glipicano 5
HBV – vírus da hepatite B
HBsAg – antigénios de superfície do HBV
HDV – vírus da hepatite delta
HDAg – antigénio delta
HCC – carcinoma hepatocelular
HCV – vírus da hepatite C
HRP – peroxidase de rábano
HSPGs – proteoglicanos sulfato de heparano
IFN α – interferão α
kDa – kilodaltons
LB – meio de lisogenia
LHBsAg – antigénio de superfície grande do HBV
L-HDAg – forma grande do antigénio delta
logFC – logaritmo de base 2 do *fold-change*
MHBsAg – antigénio de superfície médio do HBV
mRNA – RNA mensageiro
NES – sinal de exportação nuclear
NF- κ B – factor nuclear κ B
nm – nanómetro
NLS – sinal de localização nuclear
NTCP – polipéptido co-transportador de sódio taurocolato
ORF – grelha de leitura aberta
pb – pares de bases
PBS – solução salina tamponada de fosfatos

PCR – reacção de polimerase em cadeia
PEG-IFN α – interferon α peguado
Rb – proteína retinoblastoma
RBD – domínio de ligação a RNA
Rev – *reverse*
RNA – ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNA pol I – RNA polimerase I
RNA pol II – RNA polimerase II
RNA-seq – sequenciação de RNA
RNP – ribonucleoproteína
ROS – espécies reactivas de oxigénio
rpm – rotações por minuto
RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640
SHBsAg – antígeno de superfície pequeno do HBV
S-HDAg – forma pequena do antígeno delta
siRNA – small interference RNA
TAE – tampão Tris-acetato-EDTA
TREs – elementos sensíveis a TPA

1. Introdução

1.1 O vírus da hepatite delta

O vírus da hepatite delta (HDV) foi descoberto em 1977 por Rizzetto e colaboradores, ao observarem por imunofluorescência o antígeno delta (HDAg) em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite B (HBV) (Rizzetto *et al.*, 1977). Só mais tarde, nos anos 80, se compreendeu que se tratava de um novo vírus, sendo o seu genoma descrito e caracterizado, considerando-se o HDV como um vírus satélite do HBV (Chen *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986). Devido à sua singularidade foi classificado como o único representante da família *Deltaviridae* e do género *Deltavirus* (Rizzetto, 2016).

O vírus da hepatite delta é, da mesma forma que o HBV, transmitido essencialmente por via parenteral, através do contacto com sangue ou outros fluídos corporais de indivíduos infectados (Hughes *et al.*, 2011).

O genoma do HDV é constituído por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) circular, de cadeia simples e polaridade negativa, com cerca de 1700 nucleótidos (Kos *et al.*, 1987). Este possui apenas uma grelha de leitura aberta (ORF) que codifica para a única proteína do HDV, o antígeno delta. No entanto, devido a uma modificação que ocorre durante a transcrição, este possui duas formas: a pequena (S-HDAg) e a grande (L-HDAg) (Chao *et al.*, 1990; Luo *et al.*, 1990).

O invólucro do HDV é constituído por antígenos de superfície do HBV (HBsAg), daí a necessidade da presença do HBV para uma infecção com sucesso pelo HDV. Tal uso dos HBsAg pelo HDV é facilitado pela produção de inúmeras partículas virais vazias durante a infecção por HBV (Heermann & Gerlich, 1991).

No interior do invólucro, a partícula viral consiste numa ribonucleoproteína (RNP) com um rácio molar de cerca de 200 antígenos delta por molécula de RNA (Gudima *et al.*, 2002) (Figura 1.1).

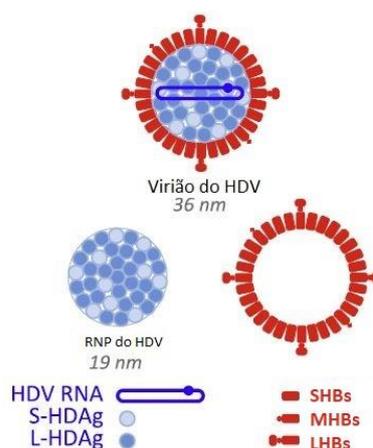


Figura 1.1: Representação esquemática do virião do HDV, com o genoma do HDV e ambas as formas do antígeno delta (a azul), assim como o invólucro constituído pelos antígenos de superfície do HBV (a vermelho). O diâmetro do virião e da RNP encontram-se indicados em nanómetros (nm) (adaptado de Sureau & Negro, 2016).

A infecção por HDV ocorre normalmente de uma das seguintes duas formas: ou o indivíduo é simultaneamente infectado com ambos os vírus (HBV e HDV), a denominada co-infecção, normalmente transitória e conferindo um prognóstico favorável em 95% dos casos, sendo que nos restantes o indivíduo desenvolve uma infecção crónica por HDV, apresentando assim a mesma taxa de progressão para cronicidade que uma mono-infecção por HBV (Simpson *et al.*, 1994; Caredda *et al.*, 1983); ou o indivíduo com uma infecção crónica por HBV é infectado com HDV, a denominada superinfecção, que geralmente possui um desfecho diferente, uma vez que mais de 80% dos indivíduos super-infectados ficam cronicamente infectados com ambos os vírus, sendo que 10 a 15 % desses desenvolvem cirrose até 2 anos após a infecção (Smedile *et al.*, 1982; Yurdaydin *et al.*, 2010).

A infecção por HDV é restrita ao fígado, sendo o HDV capaz de induzir a forma mais agressiva de hepatite, porém os indivíduos infectados tanto podem estar assintomáticos como sofrer de falência hepática aguda (Sureau & Negro, 2016). Histologicamente a hepatite delta aguda é caracterizada por necrose e inflamação dos hepatócitos, com a entrada dos linfócitos e das células de Kupfer nas regiões do parênquima e portal do fígado. Apesar de semelhante a outras hepatites virais, este padrão é normalmente mais intenso na infecção por HDV (Botelho-Souza *et al.*, 2017).

1.1.1 Entrada do HDV nas células

Uma vez que o HDV possui um invólucro igual ao do HBV, os processos de entrada na célula assumem-se ser semelhantes (Taylor, 2013).

O invólucro do HBV possui lípidos e 3 diferentes proteínas virais codificadas a partir de uma única ORF, diferindo no seu tamanho pois a sua tradução começa em codões diferentes, mas partilham o mesmo codão Stop (Figura 1.2). Estes antigénios são designados tendo em conta o seu tamanho por: SHBsAg (pequeno), MHBsAg (médio) e LHBsAg (grande) (Heermann *et al.*, 1984).

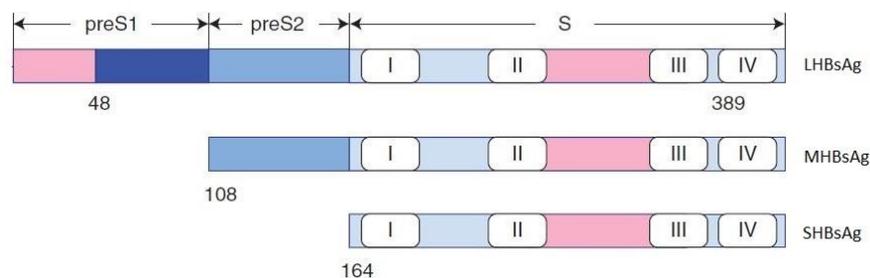


Figura 1.2: Estrutura dos antígenos de superfície do HBV: SHBsAg, MHBsAg e LHBsAg. A região S é comum aos 3 antígenos, enquanto a preS2 apenas se encontra no MHBsAg e no LHBsAg, e a preS1 apenas no LHBsAg. Na região S encontram-se 4 domínios transmembranares (I-IV). A região a rosa no preS1 (do LHBsAg) é essencial para o sucesso da infecção viral, devido à sua interacção com o receptor celular (adaptado de Watashi & Wakita, 2015).

Enquanto o invólucro do HBV possui quantidades semelhantes dos 3 antígenos, o invólucro do HDV, apesar de também conter lípidos e os 3 antígenos de superfície do HBV, possui menores quantidades do MHBsAg e do LHBsAg. O SHBsAg é suficiente para a montagem de viriões de HDV, contudo é necessária a presença de LHBsAg para que esses sejam infecciosos, pois apenas o LHBsAg possui o domínio preS1, que se liga ao receptor celular responsável pela entrada do vírus na célula (Sureau *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 2007).

Tanto o HBV como o HDV ligam-se aos hepatócitos por meio de proteoglicanos sulfato de heparano (HSPGs) que existem na superfície dos hepatócitos (Longarela *et al.*, 2013). Recentemente foi identificado o glicoproteína 5 (GPC5) como um dos membros da família de HSPGs, mediando a ligação do HDV (e do HBV) aos hepatócitos (Verrier *et al.*, 2016). Posteriormente é feita a ligação ao receptor celular, o polipéptido co-transportador de sódio taurocolato (NTCP) (Yan *et al.*, 2012). Este péptido é predominante expresso nos hepatócitos explicando o elevado tropismo desses vírus para o fígado (Hagenbuch *et al.*,

1991; Hilgendorf *et al.*, 2007). O NTCP, codificado pelo gene SLC10A1, é um transportador de ácido biliar dependente de sódio responsável pela entrada da maioria dos ácidos biliares circulantes no sangue para o fígado, possuindo um importante papel na homeostase destes ácidos e encontrando-se distribuído principalmente na membrana basolateral dos hepatócitos (Dawson *et al.*, 2009; Anwer & Stieger, 2014; Watashi & Wakita, 2015).

1.1.2 Replicação do HDV

Após a entrada do HDV nas células e remoção do invólucro, a RNP é transportada para o núcleo num processo mediado pelo antigénio delta, e apesar desta se acumular principalmente no núcleo durante o curso da infecção, há um contínuo movimento da RNP entre o núcleo e o citoplasma (Chou *et al.*, 1998; Tavanez *et al.*, 2002).

Tendo em conta a simplicidade do HDV e o facto de não possuir qualquer polimerase associada, este necessita de utilizar a maquinaria da célula infectada para replicar o seu genoma. A replicação ocorre através de um mecanismo de círculo rolante (Taylor, 1992), dando origem a um intermediário de replicação denominado de anti-genoma. Este processo origina moléculas multiméricas de anti-genoma, pelo que é necessário que ocorra um corte para que cada cópia seja individualizada e se possa circularizar. Este corte acontece devido às actividades ribozímicas presentes no genoma e no anti-genoma, que consistem em sequências de cerca de 85 nucleótidos capazes de auto-clivagem e auto-ligação (Wu *et al.*, 1989). Pelo mesmo mecanismo, a partir de moléculas individuais de anti-genoma são formadas moléculas multiméricas de genoma, que após corte devido às actividades ribozímicas, tornam-se novamente circulares e monoméricas (Figura 1.3).

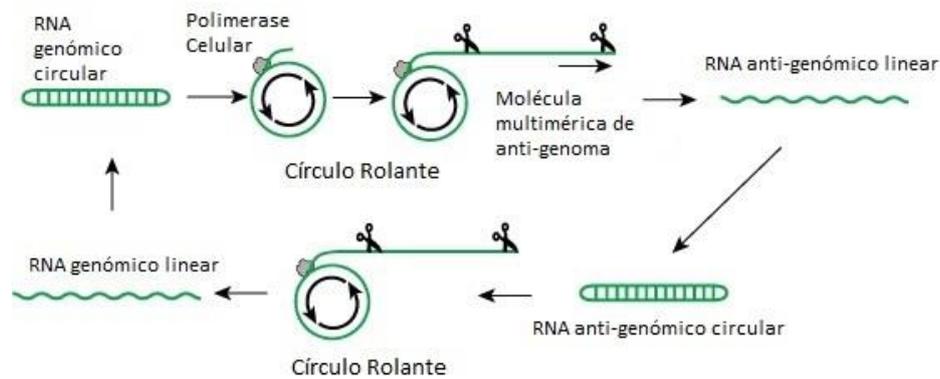


Figura 1.3: Mecanismo de círculo rolante. Mecanismo pelo qual são formadas novas moléculas de genoma (e anti-genoma) de HDV na célula infectada com auxílio de uma polimerase celular, originando a formação de moléculas multiméricas que são depois clivadas por via da actividade ribozímica (indicada pelas tesouras na figura) presente no genoma e anti-genoma do vírus, levando à formação de moléculas circulares e monoméricas (adaptado de SIB).

Uma vez que nem a célula possui nem o vírus transporta consigo nenhuma polimerase de RNA dependente de RNA, a conformação do vírus em forma de bastonete parece servir como promotor para a RNA polimerase II celular (RNA pol II) transcrever o genoma do HDV. Apesar de existir algum consenso na utilização da RNA pol II para a transcrição do genoma, Macnaughton e colaboradores sugerem que o anti-genoma seja transcrito pela RNA polimerase I (RNA pol I), baseando-se nas diferentes quantidades de genoma e anti-genoma presentes na célula infectada (cerca de 300000 moléculas de genoma para 50000 de anti-genoma em cada hepatócito infectado) assim como no facto de apenas o genoma ser incluído nas novas partículas virais (Macnaughton *et al.*, 2002; Gudima *et al.*, 2002; Taylor, 2015).

Outra etapa fundamental na replicação do HDV consiste na transcrição de um RNA mensageiro (mRNA) de polaridade igual ao anti-genoma, essencial para a tradução do antigénio delta (Sureau & Negro, 2016). Este processo envolve a participação da RNA pol II, uma vez que o mRNA resultante possui os mesmos elementos que um mRNA celular (transcritos pela RNA pol II) – cap 5' e cauda poli-A 3' (Gudima *et al.*, 1999). Nas fases iniciais da infecção, o HDAG é traduzido na sua forma pequena, com 195 aminoácidos, até que por acção da enzima celular ADAR1 (uma deaminase de adenosinas que actua em RNA) existe a tradução da forma grande (L-HDAG) através de uma alteração no anti-genoma que leva à extensão do mRNA transcrito (Jayan & Casey, 2002). A ADAR1 tem como função deaminar uma adenosina, convertendo-a numa inosina,

traduzida como guanosina. Isto significa que o codão UAG (normalmente traduzido como codão Stop) é convertido num codão UIG traduzido no aminoácido triptofano, prolongando a grelha de leitura (Luo *et al.*, 1990). O L-HDAg (com peso molecular de 27 kilodaltons (kDa)) possui mais 19 aminoácidos que o S-HDAg (com peso molecular de 24 kDa) num total de 214 aminoácidos.

Apesar de serem bastante semelhantes, as duas formas do antígeno delta apresentam funções distintas. O S-HDAg é essencial para a replicação do HDV, possuindo um papel importante nas fases iniciais da infecção, enquanto que o L-HDAg reprime a replicação do HDV e promove o empacotamento das partículas virais. No entanto, ambas as formas aparentam ter uma função em comum, a de diminuir a replicação do HBV (Chang *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 1990; Ryu *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 2009).

Tanto o S-HDAg como o L-HDAg, possuem vários domínios já caracterizados, tais como um sinal de localização nuclear (NLS) responsável pela localização das ribonucleoproteínas do HDV no núcleo, um domínio de ligação a RNA (RBD) e um domínio super-enrolado (ou *coiled-coil*) (CCD). O L-HDAg possui ainda, nos seus aminoácidos adicionais, um sinal de exportação nuclear (NES) (Chou *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001) (Figura 1.4).

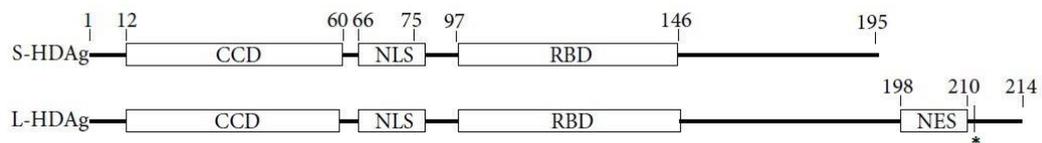


Figura 1.4: Domínios funcionais do S-HDAg e L-HDAg. Em ambas as formas do antígeno delta é encontrado um domínio CCD, um domínio NLS e um domínio RBD. Nos 19 aminoácidos adicionais do L-HDAg encontra-se um domínio NES. Na figura está assinalado o resíduo 211 (*), alvo de iso-prenilação pós traducional, que promove a ligação do L-HDAg aos HBsAg. Os números da figura indicam as posições dos aminoácidos (adaptado de Alves *et al.*, 2013).

Ambas as formas do antígeno delta sofrem diversas modificações pós-traducionais, entre as quais fosforilações, metilações, acetilações e sumoilações (Li *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2004; Hong & Chen, 2010; Tseng *et al.*, 2010). Contudo a mais estudada talvez seja a iso-prenilação do L-HDAg, uma vez que é necessária para o empacotamento das partículas virais, promovendo a interação com os antígenos de superfície do HBV (Otto & Casey, 1996). Esta iso-prenilação, levada a cabo por uma farnesil-transferase celular, trata-se de uma adição de um lípido isoprenóide a um resíduo de cisteína. Na ausência

desta farnesilação, o L-HDAg exibe uma menor capacidade de se ligar aos HBsAg, reduzindo a formação de viriões de HDV (Lee *et al.*, 1994).

1.1.3 Epidemiologia e tratamentos

Os dados mais recentes estimam que 5% dos infectados com HBV estejam também infectados com HDV, o que corresponde a cerca de 15 a 20 milhões de pessoas infectadas no mundo inteiro (Rizzetto & Ciancio, 2012). Em Portugal, a infecção por HDV é considerada uma ocorrência pouco comum, não existindo dados específicos sobre o número de indivíduos infectados. Quanto ao número de infectados por HBV, a Direcção Geral de Saúde estima que 0,4 a 1 % da população portuguesa seja portadora de HBsAg (DGS, 2017).

A infecção por HDV é epidémica principalmente na região mediterrânica, no médio oriente, na área norte da América do Sul e na África central. É também bastante prevalente na Turquia, Ásia central e região da Amazónia (Alves *et al.*, 2013).

Actualmente estão descritos 8 genótipos de HDV, apresentando a distribuição mundial apresentada na figura 1.5 (Dény, 2006; Le Gal *et al.*, 2006). O genótipo 1 é o mais comum e encontra-se disseminado por todo o globo. No entanto é o genótipo 3 que provoca a forma mais severa da infecção, encontrando-se exclusivamente em indivíduos que vivem junto à bacia do rio Amazonas (Paraná *et al.*, 2006). Essa severidade deve-se ao facto de no genótipo 3 a produção de partículas virais ser cerca de 20 vezes maior do que numa infecção pelo genótipo 1 (Botelho-Souza *et al.*, 2015). Os genótipos 2 e 4 encontram-se sobretudo na zona do Japão e de Taiwan e normalmente correspondem às formas menos severas da infecção por HDV (Su *et al.*, 2006; Huang & Lo, 2014). Os genótipos 5 a 8 são, na maior parte dos casos, encontrados em indivíduos do continente africano.

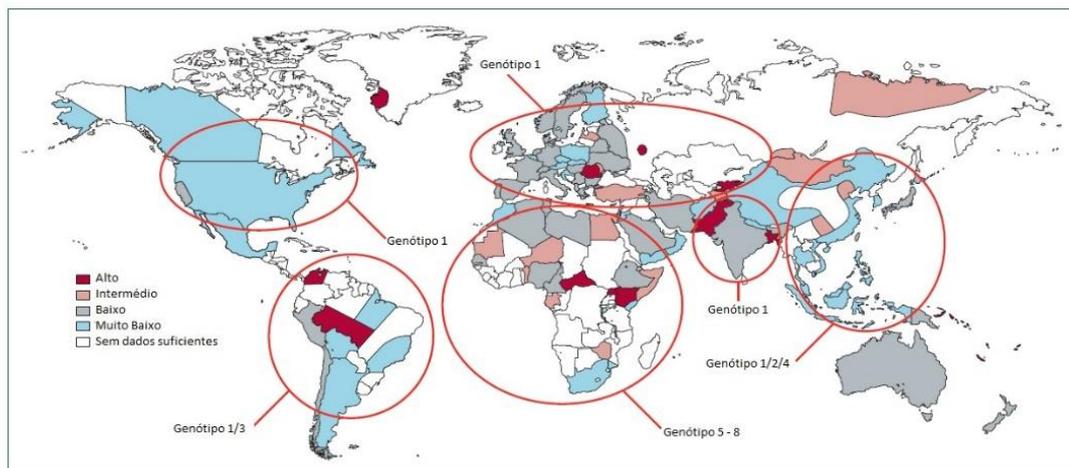


Figura 1.5: Prevalência do HDV e distribuição geográfica dos genótipos. O genótipo 1 encontra-se por todo o globo, enquanto os genótipos 2 e 4 são normalmente predominantes no Sudeste Asiático, e o genótipo 3 na América do Sul. Por sua vez, os genótipos 5 a 8 parecem estar limitados ao continente africano (adaptado de Hughes *et al.*, 2011).

Dentro do mesmo genótipo pode existir uma variabilidade até 16% e entre os diferentes genótipos a distância genética é de 20 a 40% (Wu *et al.*, 1998; Botelho-Souza *et al.*, 2015). Esta heterogeneidade está localizada principalmente na região C terminal do L-HDAg (Botelho-Souza *et al.*, 2015).

Existe uma potencial relação entre o genótipo do HDV e o do HBV, sendo que por exemplo, uma associação entre o genótipo 3 do HDV e o genótipo F do HBV evidencia piores prognósticos (Kiesslich *et al.*, 2009; Casey *et al.*, 1996). Também a associação entre o genótipo 1 do HDV e o genótipo C do HBV parece estar relacionada com um pior prognóstico (Su *et al.*, 2006). Por sua vez, o genótipo A do HBV poderá estar relacionado com uma menor carga viral de HDV em doentes co-infectados com HBV e HDV (Kiesslich *et al.*, 2009).

Não existe actualmente, uma terapia eficiente e específica contra o vírus da hepatite delta (Elazar *et al.*, 2017). Tal deve-se à grande simplicidade do vírus, possuindo um só gene que codifica para o antigénio delta que não possui uma função enzimática conhecida que possa ser utilizada como alvo (Gunsar, 2013). O sucesso da terapia, no caso do HDV, é normalmente descrito como a normalização da alanina aminotransferase no soro, assim como a não detecção de RNA viral no soro do doente (Gunsar, 2013).

Diferentes abordagens têm sido feitas ao longo dos últimos anos, no sentido de identificar a terapia mais adequada.

O largo espectro de acção do interferão α (IFN α) levou a que este tenha sido uma das primeiras terapias testadas (Farci *et al.*, 1994; Gunsar *et al.*, 2005; Yurdayin *et al.*, 2007). Todavia os efeitos secundários do tratamento com IFN α são bastante frequentes e por vezes graves, principalmente em doentes com infecções crónicas mais prolongadas (Gunsar, 2013). Uma versão peguilada do interferão α (PEG-IFN α) tem sido também alvo de diversos estudos clínicos, contudo no geral a sua utilização isolada tem sensivelmente os mesmos resultados que o IFN α (Elazar *et al.*, 2017).

A utilização de análogos de nucleósidos, isoladamente ou em conjugação com IFN α , tem sido largamente testada com diferentes resultados conforme o análogo de nucleósido utilizado, assim como as características do grupo de doentes (revisto em Gunsar, 2013). Para doentes com estadios muito avançados da infecção, o transplante hepático pode ser a sua única solução, uma vez que o risco de recorrência da infecção por HDV após o transplante hepático, é bastante inferior do que nos casos de infecção por HBV ou pelo vírus da hepatite C (HCV) (Niro *et al.*, 2005; Gunsar, 2013).

Após a identificação do receptor (NTCP) que permite a entrada do HDV nas células diversas tentativas foram feitas para produzir um fármaco que se ligasse ao NTCP, impedindo assim a ligação do HDV e a sua entrada. Actualmente em ensaios clínicos encontra-se o Myrcludex B, um péptido de 47 aminoácidos, derivado do domínio pre-S1 do LHBsAg (Volz *et al.*, 2013; Blank *et al.*, 2016). O Myrcludex B impede a formação de intermediários de replicação em hepatócitos *naïve*, levando por isso a uma diminuição das células infectadas ao longo da administração contínua do fármaco (Bogomolov *et al.*, 2016). Um estudo em 24 doentes co-infectados com HBV e HDV durante 24 semanas, produziu resultados promissores na diminuição da carga viral, tanto com a administração isolada de Myrcludex B, assim como em associação com PEG-IFN α (Bogomolov *et al.*, 2016).

Recentemente têm sido feitos novos avanços no estudo de inibidores de farnesilação, que poderão dar origem a uma nova classe de fármacos, com o objectivo de inibir a interacção do L-HDAg com os antigénios de superfície do HBV (Gunsar, 2013; Elazar *et al.*, 2017). Num estudo publicado em 2015, Koh e colaboradores apresentaram os resultados de um ensaio clínico com 14 doentes onde lhes foi administrado diferentes quantidades de um inibidor de farnesilação denominado Lonafarnib, e observaram uma diminuição dos

níveis do RNA de HDV relacionado com a quantidade de fármaco administrado, tendo sido apenas registados efeitos secundários ligeiros a moderados (Koh *et al.*, 2015).

1.2 O HDV e o Carcinoma Hepatocelular

O cancro de fígado é um problema mundial, sendo a segunda maior causa de morte relacionada com cancro e responsável por cerca de 700000 mortes por ano globalmente (Torre *et al.*, 2015). Entre as diferentes neoplasias hepáticas, o carcinoma hepatocelular (HCC) é o mais comum, com uma incidência acima dos 90 %. Mais de 80 % dos casos reportados de HCC são devido a infecções crónicas pelos vírus da hepatite B, C e delta (Wang *et al.*, 2017; Nordenstedt *et al.*, 2010).

Wu e colaboradores descreveram três fases na infecção por HDV: a fase aguda, onde existe replicação do HDV e supressão da replicação do HBV; a fase crónica, onde existe uma diminuição da replicação do HDV e reactivação da replicação do HBV e uma fase tardia, onde existe o desenvolvimento de cirrose e de carcinoma hepatocelular, causado pela replicação de ambos os vírus (Wu *et al.*, 1995). Aceita-se, por isso, que um indivíduo infectado com HBV e HDV terá uma mais rápida e mais grave progressão da doença hepática (Shirvani-Dastgerdi *et al.*, 2016).

A infecção por HDV leva ao desenvolvimento de cirrose numa taxa anual de 4%, o que aumenta o risco de descompensação hepática em cerca de 2 vezes, o risco de desenvolver HCC em aproximadamente 3 vezes e a mortalidade associada em 2 vezes face a doentes com fígados cirróticos devido a infecção apenas por HBV (Romeo *et al.*, 2009; Fattovich *et al.*, 2000). O nível da viremia de HDV é o principal potenciador da progressão da doença em doentes com hepatite delta crónica (Romeo *et al.*, 2014). Contudo os mecanismos por detrás da rápida progressão da doença hepática ainda não são completamente conhecidos, uma vez que a expressão do antigénio delta por si só não tem efeito citopático nem possui potencial oncogénico (Shirvani-Dastgerdi *et al.*, 2016). Por outro lado, a replicação do HDV promove a desregulação de várias vias de sinalização celular, induz o aumento do stress oxidativo e origina diversas alterações epigenéticas (Abbas *et al.*, 2015).

1.2.1 Alterações de expressão génica associadas à infecção por HDV

Apesar dos mecanismos pelos quais o vírus da hepatite delta acelera a progressão da doença hepática não serem ainda completamente conhecidos, estudos recentes apontam para que o HDV possa promover alterações de expressão num conjunto de genes, cujos efeitos serão visíveis em diversos mecanismos celulares. Exemplo disso, são os estudos que indicam que a existência da infecção por HDV e a replicação activa do vírus influencia a via de sinalização JAK-STAT, causando por exemplo, a resistência ao IFN α usado como terapia. O HDV subverte o efeito do IFN α ao bloquear a activação de Tyk2, impedindo assim a activação (fosforilação) de STAT1 e STAT2 (Pugnale *et al.*, 2009). Por outro lado, devido ao aumento de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na presença do L-HDAg existe activação de STAT3 e do factor nuclear κ B (NF- κ B), podendo esse aumento estar relacionado com a evolução da doença hepática nas infecções por HDV (Williams *et al.*, 2012).

Um outro mecanismo pelo qual o HDV poderá contribuir para o mais rápido desenvolvimento de HCC será a promoção de alterações epigenéticas. Um exemplo recente, reportado por Benegiamo e colaboradores, foi a demonstração de que a infecção por HDV induz o aumento da expressão da DNMT3b (DNA metiltransferase 3b), uma enzima responsável pela introdução de grupos metilo no ácido desoxirribonucleico (DNA). Este estudo identificou ainda que o promotor do gene E2F1 se encontrava hipermetilado aquando da infecção por HDV, sendo que este gene tem um papel importante no controlo do ciclo celular e na acção das proteínas supressoras tumorais (Benegiamo *et al.*, 2013). Estas observações revelam que o HDV poderá ter a capacidade de influenciar enzimas modificadoras da cromatina, o que por sua vez poderá induzir alterações epigenéticas em determinados genes e respectivas alterações transcricionais, alterando os mecanismos de funcionamento normal da célula.

A replicação do HDV parece também potenciar a acetilação de histonas o que pode levar à indução da sobre-expressão de clusterina (Liao *et al.*, 2009). A clusterina é uma proteína associada a diferentes funções celulares como actividade de *chaperone* e envolvimento na regulação da morte celular. Apesar de não se saber ainda a influência da clusterina no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, a sua sobre-expressão encontra-se relacionada com inibição de apoptose noutros cancros (Miyake *et al.*, 2006).

Por último, é possível também que a presença do HDV leve a alterações em RNAs não codificantes, uma vez que já existem diversos estudos que indicam a sua importância no desenvolvimento de processos tumorais e inclusive em HCC (revisado em Wong *et al.*, 2018). Um estudo que procurou a existência de alterações em RNA longos não codificantes em carcinomas hepatocelulares de diversas etiologias, identificou o RNA não codificante Y3 como sendo menos expresso em tecidos tumorais na presença de infecção por HDV (Zhang *et al.*, 2016). Apesar de se desconhecer a existência de uma ligação directa entre infecção por HDV e a diminuição de expressão do Y3, esta alteração poderá ser relevante pois RNAs desta família foram já associados a cancros de diversos tecidos (Christov *et al.*, 2008).

1.3 Sequenciação de RNA

Os RNAs presentes numa célula caracterizam a sua identidade e ajudam a determinar o seu presente e futuro. Deste modo, a análise do transcriptoma tornou-se uma técnica comum para compreensão de fenótipos.

A técnica de sequenciação de RNA (RNA-seq) permite perceber como se encontra o transcriptoma de um conjunto de células num determinado momento ou condição (Wang *et al.*, 2009). O RNA-seq permite não só a análise dos RNAs mensageiros, mas também de outros tipos de RNA, como por exemplo RNAs não codificantes. Utiliza a metodologia de *next generation sequencing* aplicada ao transcriptoma através da sequenciação do DNA complementar (cDNA) (Wang *et al.*, 2009; Ozsolak & Milos, 2011). Comparativamente com outras metodologias, por exemplo *microarrays*, o RNA-seq proporciona uma maior cobertura e resolução da dinâmica do transcriptoma (Kukurba & Montgomery, 2015). Os principais objectivos do RNA-seq são a catalogação de todos os transcritos e inclusive a descoberta de novos transcritos, a identificação de padrões de *splicing* alternativo e a detecção de expressão de transcritos específicos de certos alelos (Kukurba & Montgomery, 2015).

Resumidamente, após a extracção dos RNAs da amostra pretendida, esses são fraccionados aleatoriamente em pequenos fragmentos e sujeitos a transcrição reversa para cDNA com recurso a *primers* aleatórios. O cDNA é então amplificado e sequenciado resultando em milhões de pequenas sequências, designadas por *reads*. Essas *reads* são então mapeadas no genoma (ou transcriptoma) do organismo em estudo. O número de

reads mapeado em cada região de interesse (por exemplo, um gene ou um exão) providencia o nível de expressão dessa região (Li *et al.*, 2012) (Figura 1.6).

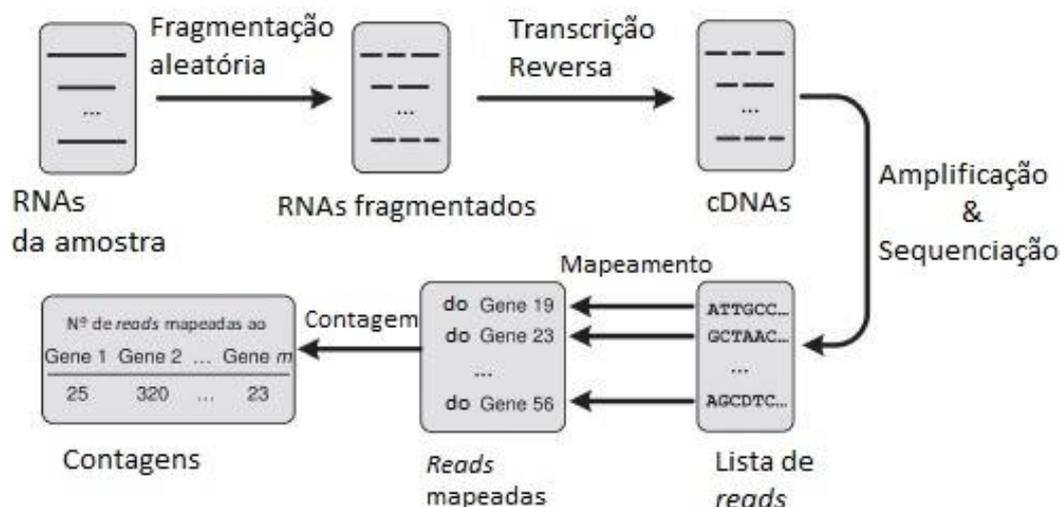


Figura 1.6: Representação esquemática de uma experiência de RNA-seq típica. Primeiramente o RNA extraído é fraccionado em fragmentos mais pequenos e sujeito a transcrição reversa com recurso a *primers* aleatórios. O cDNA obtido é amplificado e sequenciado, resultando em diversas *reads*, que podem ser mapeadas ao genoma do organismo e contadas para quantificar a expressão (adaptado de Li *et al.*, 2012).

Se forem obtidas *reads* em número suficiente (superior a 40 milhões), em teoria é possível detectar e quantificar RNAs de todas as classes relevantes biologicamente, assim como mapear eventos de *splicing* em RNAs moderada e altamente abundantes (Mortazavi *et al.*, 2008).

Geralmente pretende-se obter os genes diferencialmente expressos entre duas ou mais condições. Existem diferentes técnicas estatísticas, revistas em Fang *et al.*, 2012, que podem ser aplicadas de forma a obter um *p-value* para cada gene, indicando qual a confiança estatística de este ser diferencialmente expresso (Li *et al.*, 2012). Contudo, devido ao alto número de genes obtidos numa experiência de RNA-seq, é bastante importante a correcção para comparações múltiplas, sendo normalmente utilizada a FDR (taxa de descobertas falsas) para controlar os múltiplos testes (Benjamini & Hochberg, 1995).

Com a grande quantidade de dados obtidos pelas novas técnicas de sequenciação surgiu a necessidade de automaticamente agrupar os elementos genómicos a diferentes níveis, surgindo o projecto de *Gene Ontology* que disponibiliza um vocabulário de forma a

descrever cada gene (de todos os eucariotas), associando-o a processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares (Ashburner *et al.*, 2000). Uma das aplicações mais comuns é a análise de enriquecimento, isto é, a identificação dos termos que estão significativamente sobre-representados numa amostra de genes, podendo sugerir possíveis características funcionais dessa amostra (Khatri & Drăghici, 2005; Eden *et al.*, 2009).

1.4 Objectivo principal

O presente trabalho teve como objectivo principal a identificação de genes diferencialmente expressos, em linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, infectadas com HDV, através da utilização da técnica de RNA-seq.

1.4.1 Objectivos específicos

De forma a complementar o objectivo principal, identificaram-se adicionalmente cinco objectivos específicos:

1. Validar experimentalmente a expressão diferencial de genes identificados por RNA-seq;
2. Identificar c-fos como gene importante na infecção por HDV;
3. Identificar o componente do HDV responsável pela expressão diferencial de c-fos na infecção por HDV;
4. Analisar os níveis de expressão de genes integrantes do complexo AP-1 após infecção por HDV;
5. Analisar os níveis de expressão de transcritos dependentes de c-fos após infecção por HDV.

2. Material e Métodos

2.1 Linha celular

Na realização deste trabalho foram utilizadas células da linha celular HuH-7 (*Japanese Collection of Research Bioresources* número 0403), que derivam de carcinoma hepatocelular humano de um indivíduo do sexo masculino com 57 anos e nacionalidade japonesa (Nakabayashi *et al.*, 1982). Após descongelação, as células foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Moore *et al.*, 1967) (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Gibco) e 1X de Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em frascos de 75 cm² (T75 com tampa ventilada para células aderentes, Sarstedt) a 37° C e numa atmosfera de 5% CO₂. Quando as células atingiam cerca de 90% de confluência, eram efectuadas passagens, com uma diluição de 1:3, e recurso a tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma-Aldrich).

Toda a manipulação das células foi efectuada numa câmara de fluxo laminar (BSB3, Gelaire) com todas as precauções para evitar contaminações.

2.2 Transformação de bactérias com plasmídeos

Para amplificação dos plasmídeos utilizados nas transfecções em células HuH-7 (capítulo 2.3) foram utilizadas bactérias competentes DH5 α (Thermo Fisher). Após descongelação, a 50 μ l de bactérias foi adicionado 100 ng de DNA do plasmídeo a amplificar, ficando depois 30 minutos em gelo. De seguida foi-lhes dado um choque térmico de 42° C durante 45 segundos, e colocadas em gelo durante 2 minutos. Após esse tempo foi adicionado 950 μ l de meio LB (meio de lisogenia; Bertani, 1951) e o tubo foi colocado durante 1 hora a 37° C com agitação. Ao fim dessa hora, 100 μ l foram plaqueados numa placa de LB-ágar com ampicilina a 100 ng/ml, a qual foi deixada durante a noite a 37° C.

No dia seguinte, uma colónia isolada foi repicada e colocada em cerca de 8 ml de meio LB com ampicilina e mantida durante 16 horas a 37° C com agitação. Findo esse período, obteve-se um *pellet* bacteriano por centrifugação (a 8000 rotações por minuto, rpm) no qual se aplicou o protocolo de extracção de DNA plasmídico QIAprep Miniprep (Qiagen) em que inicialmente é feita a ressuspensão do *pellet* em 250 μ l do tampão P1, seguida da lise bacteriana alcalina através da adição de 250 μ l de tampão P2. A neutralização ocorre com a adição de 350 μ l do tampão N3, seguida de uma centrifugação de 10 minutos a

13000 rpm, onde o *pellet* formado é descartado. O sobrenadante foi transferido para uma coluna Qiaprep 2.0 e centrifugado durante 1 minuto na mesma velocidade, sendo descartado o líquido que atravessou a coluna. Adicionou-se 750 µl do tampão PE, efectuando-se depois duas centrifugações de 1 minuto na velocidade máxima. A coluna foi então transferida para um tubo de 1,5 ml e após adição de 50 µl de água livre de nucleases, aguardou-se 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 2 minutos à mesma velocidade, onde foi eluído o DNA do plasmídeo de interesse. Após quantificação no NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) e visualização através de electroforese em gel de agarose (SeaKem LE, Lonza) a 1% foi guardado a -20° C até futura utilização.

2.3 Transfecção de células HuH-7 com plasmídeos de HDV

Em células HuH-7 foi efectuada uma transfecção transiente com recurso ao plasmídeo pSVL(D3) (ATCC 45137D). Este plasmídeo contém 3 cópias de cDNA do genoma do HDV, extraído do fígado de marmotas infectadas com HDV humano, no vector de expressão pSVL, permitindo a expressão de todos os componentes do HDV (Kuo *et al.*, 1989).

Para cada transfecção, a cada poço de uma placa de 6 poços (TC Plate 6 Well, Sarstedt) com células HuH-7 numa confluência de 70-80% foi utilizado 3 µl do reagente FuGENE HD *Transfection Reagent* (Promega) e 97 µl de meio RPMI-1640 para 1 µg de DNA do plasmídeo, em conformidade com as indicações do fabricante. Após a transfecção, as células foram mantidas 24 horas a 37° C, numa atmosfera de 5% de CO₂ antes de se proceder à extracção do RNA.

Do mesmo modo foram também efectuadas transfecções com recurso a plasmídeos que apenas expressam o genoma e o anti-genoma do HDV: pDL542 e pDL481 respectivamente. Foram ainda realizadas transfecções com plasmídeos de expressão de ambas as formas do antigénio delta (pSVL-S-HDAg e pSVL-L-HDAg).

2.4 Extracção de RNA

A extracção do RNA total foi efectuada com recurso ao *kit* RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, segundo o protocolo de centrifugação indicado para células animais em monocamada. Brevemente, começou-se por aspirar todo o meio existente no poço, e fazer uma lavagem rápida com uma solução salina tamponada de

fosfatos (PBS). Seguidamente, foi adicionado 350 µl do tampão RLT e procedeu-se à raspagem da superfície da placa de forma a soltar as células aderentes, todo o volume foi ainda passado cerca de 10 vezes por uma agulha de 20 gauge. Posteriormente foi adicionado 350 µl de etanol a 70% e após homogeneização, todo o volume foi transferido para uma coluna mini RNeasy e centrifugou-se durante 15 segundos a 10000 rpm, descartando-se o líquido que atravessou a membrana da coluna. De seguida, adicionou-se 350 µl do tampão RW1 e centrifugou-se novamente na mesma velocidade durante 15 segundos, descartando-se o líquido que atravessou a membrana.

As amostras foram tratadas com o RNase-Free DNase Set (Qiagen), sendo que para a preparação do mesmo, procedeu-se à dissolução do liofilizado em 550 µl de água livre de RNases fornecida no *kit*. Desta forma foram adicionados 10 µl de DNase juntamente com 70 µl do tampão RDD (fornecido no *kit* da DNase), directamente na membrana da coluna. Deixou-se actuar durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Após esse tempo, adicionou-se 350 µl do tampão RW1, e centrifugou-se 15 segundos a 10000 rpm, descartando-se o líquido que atravessou a membrana. Foi então adicionado 500 µl do tampão RPE e centrifugado a 10000 rpm durante 15 segundos, descartando o volume que atravessou a membrana. Este último passo foi repetido, com uma centrifugação de 2 minutos na mesma velocidade. Após a mesma, foi trocado o tubo colector da coluna e centrifugou-se na velocidade máxima durante 1 minuto, descartando mais uma vez o líquido no fundo da coluna.

Por último, a coluna foi colocada num tubo de 1,5 ml, e adicionou-se 40 µl de água livre de nucleases (fornecida no *kit*) na membrana. Aguardou-se 1 minuto, e centrifugou-se novamente a 10000 rpm durante 1 minuto. O volume que atravessou a coluna foi guardado a -20° C após quantificação no NanoDrop 1000 (Thermo Fisher).

2.5 Transcrição reversa

As reacções de transcrição reversa foram realizadas com recurso ao *kit* NZY *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Nzytech). Brevemente, cada reacção foi efectuada num volume de 20 µl, com 1 µg de RNA, 10 µl de NZYRT 2× *Master Mix*, 2 µl de NZYRT *Enzyme Mix*, completado com água livre de nucleases (Ambion). De seguida as reacções estiveram 10 minutos à temperatura ambiente, 30 minutos a 50° C e 5 minutos a 85° C, no termociclador MJ Mini™ (BioRad). Foi então acrescentado 1 µl de NZY RNase H, e

deixou-se 20 minutos a 37° C. As amostras foram mantidas a -20° C até utilização posterior.

2.6 Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR)

As PCRs foram feitas num termociclador GenePro (Bioer) nas condições indicadas na tabela 2.1. Cada reacção foi efectuada num volume de 25 µl, contendo 12,5 µl de *Red Taq DNA Polymerase 2x Master Mix* com 1,5 mM de MgCl₂ (VWR), 0,5 µl de cada *primer* (*forward* (*Fwd*) e *reverse* (*Rev*)) a 20µM, 1 µl de cDNA e o restante de água livre de nucleases (Ambion). Os *primers* utilizados encontram-se na tabela 2.2. Excepto quando indicado o contrário, os *primers* foram desenhados no laboratório, com recurso ao *software* livre Primer3 (v. 0.4.0) (Koresaar & Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012). O gene U6 foi utilizado como gene *housekeeping*, de forma a validar os resultados.

Tabela 2.1: Condições utilizadas nas PCRs efectuadas. Todas as PCRs foram efectuadas seguindo estas condições, tanto a nível de temperatura como de duração.

Etapa	Número do ciclo	Duração	Temperatura
Desnaturação inicial	1	5 minutos	95° C
Desnaturação	2-31	1 minuto	95° C
Hibridação		1 minuto	56° C
Extensão		1 minuto	72° C
Extensão final	32	5 minutos	72° C

Os produtos de PCR foram posteriormente resolvidos em géis de agarose (SeaKem LE, Lonza) a 2% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) a 1X (VWR). Durante a preparação de cada gel, foi adicionado 5 µl de *GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000X* (Biotium). O marcador molecular utilizado em todos os géis foi o *Mass Ruler Low Range DNA Ladder* (Thermo Fisher) que contém 11 fragmentos discretos de 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 e 80 pares de bases. Foi utilizado um transiluminador para captação de imagens com recurso ao *software* QuantityOne 4.6.1 (BioRad).

Tabela 2.2: Primers utilizados nas PCRs realizadas. Sequência 3' – 5' dos primers utilizados para amplificação dos diferentes genes por PCR. Indica-se também os exões onde se localizam os primers, assim como o tamanho do produto de PCR obtido (em pares de bases – pb).

Gene	Exão (ex.)	Sequencia	Tamanho – pb
Expressão do HDV (Freitas <i>et al.</i> , 2012)	Fwd	GGACCCCTTCAGCGAACA	100
	Rev	CCTAGCATCTCCTCCTATCGCTAT	
U6	Fwd	CTCGCTTCGGCAGCACA	100
	Rev	AACGCTTCACGAATTTGCGT	
c-fos	Fwd ex. 1	AGCAGTGACCGTGCTCCTAC	285
	Rev ex. 2	GTGACCGTGCGAATGAAGTT	
LRIF1	Fwd ex. 3	GACCTCTGGAGAAGGTTTCG	221
	Rev ex. 4	GTTGGGAACCGGTGACATTA	
ATXN2	Fwd ex. 6	TGAATGGCGAACACAAAGAG	248
	Rev ex. 8	TAACTGGTTTGGCCTTGCTT	
FGFR2	Fwd ex. 5	GCTGAAAAACGGGAAGGAGT	167
	Rev ex. 6	CCAGGTGGTACGTGTGATTG	
FMO1	Fwd ex. 4	ATGGTCTGCACTGGGTTTCT	163
	Rev ex. 5	CTGTGCCAGAATTTCCATT	
GJB1	Fwd ex. 2	TCCCTGCAGCTCATCCTAGT	156
	Rev ex. 2	CCCTGAGATGTGGACCTTGT	
Smad6	Fwd ex. 3	GGCTACCAACTCCCTCATCA	144
	Rev ex. 4	TGGTCGTACACCGCATAGAG	
HAO2	Fwd ex.2	TGAAGGTGGAGCAGATGACA	158
	Rev ex.3	TGGGTGCGATACAAATAGGG	
FosB	Fwd ex.4	AAAAAGCAGAGCTGGAGTCG	178
	Rev ex.4A'	AAGGGTTAACAACGGGGAAG	
Fra1	Fwd ex.1	TCAGCCCGAGAACTTTTCAT	378
	Rev ex.4	CTTCTGCTTCTGCAGCTCCT	
Fra2	Fwd ex.2	CTCCATGTCCAACCCATACC	173
	Rev ex.3	GACGCTTCTCCTCCTCTTCA	
c-Jun	Fwd ex.1	TGGGCTATTTTATAGGGGTTG	165
	Rev ex.1A'	GAGACCAGGCTCTCTGGACA	
junB	Fwd ex.1	TGGAACAGCCCTTCTACCAC	241
	Rev ex.1	GAAGAGGCGAGCTTGAGAGA	
junD	Fwd ex.1	GCAGCTCAAGCAGAAAGTCC	314
	Rev ex.1A'	GGCGAACCAAGGATTACAAA	
Ciclina D1	Fwd ex. 4	CCTGTCCTACTACCGCCTCA	165
	Rev ex. 5	TCCTCCTCTTCTCCTCCTC	

2.7 Preparação de extractos proteicos

Após cultura em placas de 6 poços (TC Plate 6 Well, Sarstedt) de células HuH-7, assim como células HuH-7 transfectadas com pSVL(D3) (capítulo 2.3), foi feita a preparação de extractos proteicos para futura utilização em *Western Blots*. Para tal, em cada poço foi adicionado 98 µl de tampão SDS 1X (Invitrogen), 1 µl de benzonase diluída a 1:10 (Sigma-Aldrich) e 1 µl de MgCl₂ (a 500 mM). Deixou-se actuar durante 10 minutos à temperatura ambiente, após os quais todo o volume foi transferido para tubos de 1,5 ml. As amostras foram submetidas a um banho seco a 95 °C durante 5 minutos e guardadas a -20 °C até utilização futura.

2.8 Western Blot

As amostras dos extractos proteicos foram separadas em géis de SDS-Page de gradiente 4-20% (BioRad) e seguidamente transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) utilizando um sistema semi-seco (BioRad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS suplementado com 5% de leite em pó magro durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida a membrana foi incubada com anticorpos primários durante 2 horas à temperatura ambiente, e após nova lavagem com PBS durante 45 minutos, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários conjugados com HRP (peroxidase de rábano) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após uma última lavagem com PBS, o resultado foi obtido por revelação num sistema de quimiluminescência (Promega). Foram utilizados o anticorpo policlonal anti-HDAg (B3) (Abcam) numa concentração de 1:1000, e o anticorpo monoclonal anti-tubulina (Sigma-Aldrich) numa concentração de 1:10000.

2.9 Sequenciação de RNA (RNA-seq)

A sequenciação do RNA foi efectuada no *Centre for Genomic Regulation, Genomics Core Facility* localizado em Barcelona. Para tal após a extracção do RNA total de células HuH-7 e de células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3), este foi purificado e 2 µg foram submetidos ao *kit TruSeq RNA Sample Preparation* (Illumina). Após estimação das bibliotecas a utilizar, as amostras foram colocadas no sequenciador HiSeq 2500 (Illumina) para agrupamento e sequenciação. Esta foi feita por *reads paired-end*, através

do *kit* TruSeqRapid SBS (Illumina). O *software* CASAVA (versão 1.8, Illumina) foi utilizado para produção dos ficheiros, cuja qualidade foi comprovada pelo *software* FastQC (Andrews, 2010). O *software* STAR (Dobin *et al.*, 2013) foi utilizado para alinhar as *reads* ao genoma humano. Para análise da expressão génica diferencial foi utilizado o pacote EdgeR (Robinson *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2012) em ambiente R (R Core Team, 2018). Para análise de *Gene Ontology*, foi utilizada a aplicação *web* GOrilla (Eden *et al.*, 2009), utilizando a opção “*Single ranked list of genes*”.

2.10 RNA de interferência (RNAi)

O RNAi foi feito de acordo com um protocolo previamente descrito (Tavanez *et al.*, 2012). Brevemente, a cada poço de uma placa de 6 poços (TC Plate 6 Well, Sarstedt) com células HuH-7 numa confluência de 30-40%, foi adicionada uma mistura de 5 µl de interferina (Polyplus), 200 µl de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e 3 µl de oligos siRNAs comerciais para o gene pretendido (c-fos: EHU034291, Sigma-Aldrich). Como controlo negativo recorreu-se à utilização de oligos do gene da luciferase (GL2, Thermo Fisher). Após 24 horas procedeu-se a uma nova ronda de transfecção com siRNAs nas mesmas condições. As células foram mantidas 48 horas a 37° C numa atmosfera de 5% de CO₂ antes de se proceder à extracção do RNA total (capítulo 2.4), subsequente transcrição reversa para cDNA (capítulo 2.5) e PCRs pretendidas (capítulo 2.6).

3. Resultados

3.1 Estabelecimento de modelo de infecção por HDV em células HuH-7

O primeiro procedimento deste trabalho foi o estabelecimento de um modelo de infecção por HDV. Para tal, células HuH-7 foram transientemente transfectadas com 1 µg do plasmídeo pSVL(D3) e 24 horas após a transfecção foi extraído RNA total dessas células assim como de células controlo não transfectadas. De seguida, foi efectuada transcrição reversa para cDNA e PCR com recurso aos *primers* referidos na tabela 2.2 de forma a visualizar a expressão de HDV assim como do transcrito *housekeeping* U6. Os produtos de PCR foram posteriormente resolvidos numa electroforese em gel de agarose a 2%, sendo o resultado visível na figura 3.1.

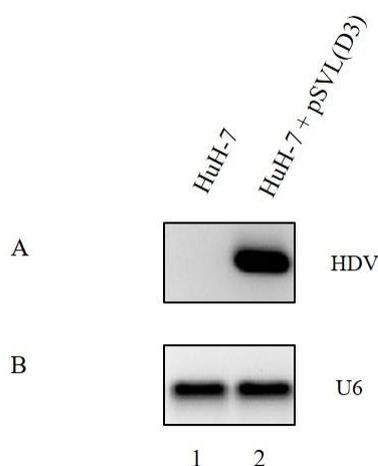


Figura 3.1: Expressão do RNA genómico do HDV em células transfectadas com pSVL(D3). Linha 1: Células HuH-7 não transfectadas. Linha 2: Células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Painel A: Expressão do RNA genómico do HDV. Painel B: Expressão de U6 (gene *housekeeping*).

Verifica-se que apenas a amostra que foi sujeita à transfecção com pSVL(D3) apresenta a banda correspondente ao produto de PCR da expressão do RNA genómico do HDV (painel A da figura 3.1). Em contraste, no gel correspondente à PCR com recurso aos *primers* de U6 é detectado o produto de amplificação em ambas as amostras (painel B da figura 3.1) validando o resultado anterior.

Paralelamente, foram também preparados extractos proteicos das duas condições experimentais por forma a ser analisada a expressão de ambas as formas do antigénio delta (S-HDAg e L-HDAg).

Os extractos proteicos foram resolvidos por SDS-Page e submetidos a um *Western Blot* recorrendo à utilização de um anticorpo policlonal anti-HDAg, que reconhece epítomos comuns a ambas as formas do antigénio delta (Tavanez *et al.*, 2002). Como controlo foi utilizado o anticorpo monoclonal dirigido à tubulina (Figura 3.2). Como é visível, detectámos ambas as formas do antigénio delta (L-HDAg e S-HDAg, com 27 e 24 kDa respectivamente) nas células transfectadas com pSVL(D3) (painel A da figura 3.2). Por outro lado, a tubulina (com 50 kDa) foi detectada em quantidade semelhante nas células transfectadas com pSVL(D3) e nas células controlo (painel B da figura 3.2), validando o resultado anterior.

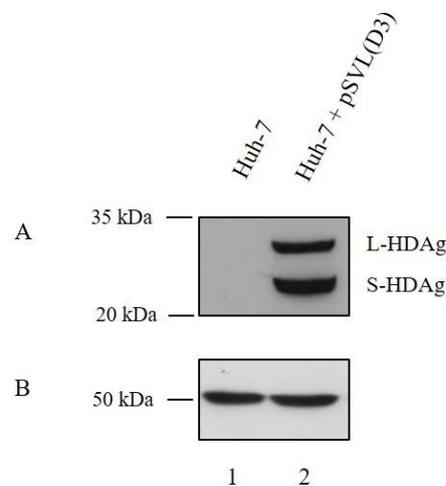


Figura 3.2: Expressão de ambas as formas do antigénio delta em células HuH-7 após transfecção com pSVL(D3). Linha 1: Células HuH-7 não transfectadas. Linha 2: Células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Painel A: Anticorpo policlonal anti-HDAg (B3), detectando o S-HDAg (24 kDa) e o L-HDAg (27 kDa). Painel B: Anticorpo monoclonal anti-tubulina (50 kDa) (controlo).

3.2 Sequenciação de RNA

Após termos demonstrado que as células HuH-7 transfectadas com pSVL(D3) apresentavam níveis de expressão significativos tanto do RNA genómico do HDV como de ambas as formas do antigénio delta, decidiu-se proceder à sequenciação do RNA total de células humanas sujeitas à expressão de todos os componentes do HDV. Para tal, células HuH-7 foram novamente transfectadas como acima descrito, em triplicado, e o

RNA total extraído dessas e de células controlo foi sequenciado no *Centre for Genomic Regulation* em Barcelona, recorrendo ao método Illumina.

Durante esse processo foram efectuados controlos de qualidade de forma a perceber quão fidedignos seriam os dados resultantes. Para tal, logo após a sequenciação foi corrido o *software* FastQC (Andrews, 2010) que detecta problemas nas *reads* devido ao sequenciador e/ou ao material sequenciado. Este *software* corre diferentes módulos permitindo analisar as amostras sequenciadas de diferentes ângulos. Um dos testes é a percentagem de conteúdo de guaninas e citosinas (GC) em cada *read*. Geralmente, devido à aleatoriedade dos resultados produzidos, é esperado que esse conteúdo siga uma distribuição normal com o pico no conteúdo GC global do genoma analisado. Como é possível ver na figura 3.3, todas as amostras sequenciadas, seguem uma distribuição normal semelhante, sendo classificadas como aprovadas (isto é, com qualidade para utilização futura) pelo FastQC.

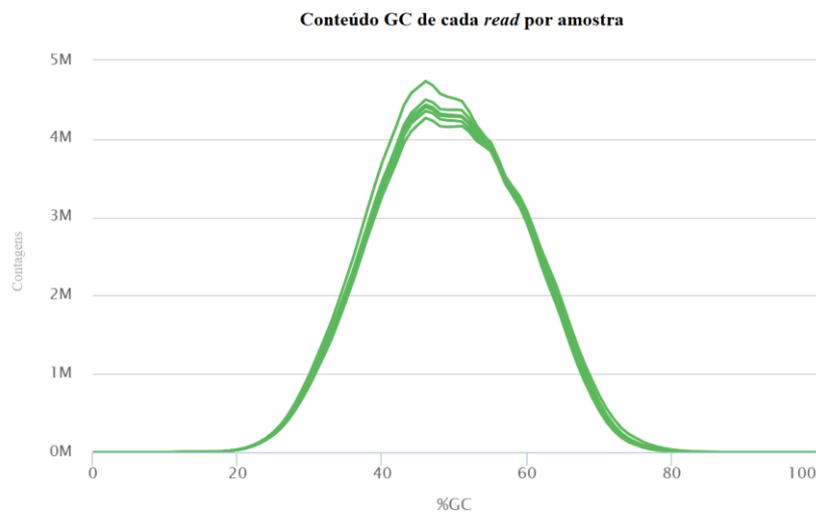


Figura 3.3: Conteúdo GC de cada read por amostra sequenciada. Número de *reads* contabilizadas com diferentes percentagens de conteúdo GC por amostra sequenciada. Cada linha verde representa uma das amostras. Como esperado é visível uma distribuição normal. Os valores apresentados no eixo das contagens encontram-se em milhões. Gráfico obtido com recurso ao MultiQC (Ewels *et al.*, 2016).

Após o alinhamento das *reads*, isto é, o mapeamento das mesmas ao genoma humano, foi feito um novo controlo que consistiu no cálculo da percentagem de *reads* em cada amostra que foi mapeada a um só sítio no genoma (como pretendido), ou onde o mapeamento não

foi possível (Figura 3.4). O próprio *software* STAR (Dobin *et al.*, 2013), utilizado para alinhar as *reads*, permite calcular estes valores.

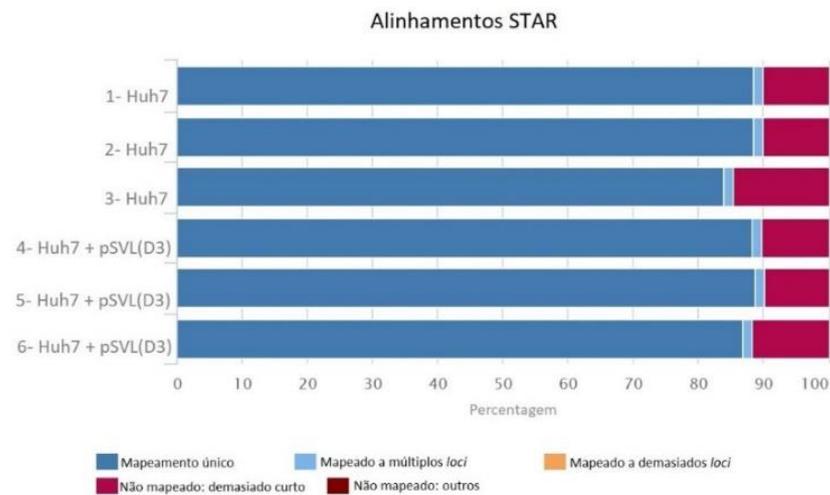


Figura 3.4: Percentagem de *reads* com diferentes tipos de alinhamentos, desde mapeamentos únicos até *reads* não mapeadas. Pode ser considerado equiparável à qualidade do alinhamento. Cada barra representa uma das amostras sequenciadas. Gráfico obtido com recurso ao MultiQC (Ewels *et al.*, 2016).

É possível verificar na figura que aproximadamente 90% das *reads* de cada amostra, foram mapeadas a um único sítio do genoma (a azul mais escuro na figura 3.4), atestando da qualidade das amostras e validando a sua utilização subsequente.

No final do processo de sequenciação do RNA, com recurso ao pacote EdgeR (Robinson *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2012), obteve-se uma lista de genes diferencialmente expressos nas duas condições experimentais, com vários *p-values* associados. Tendo em conta a variedade de *p-values* calculados, e uma vez que nem todos conferem a mesma confiança estatística, optou-se por eliminar todos os que tivessem um *p-value* corrigido com FDR superior a 0,1. Após a imposição deste limite, identificámos 153 genes diferencialmente expressos nas duas condições experimentais, discriminados na tabela 3.1. Para cada gene apresenta-se a sua referência Ensembl (Zerbino *et al.*, 2017), o logaritmo de base 2 do *fold change* de cada gene em células HuH-7 transfectadas com pSVL(D3) face a células HuH-7 não transfectadas, o *p-value* atribuído (já corrigido com FDR), o nome atribuído ao gene e o cromossoma onde o mesmo se encontra.

Tabela 3.1: Resultados do RNA-seq, com *p-value* inferior a 0,1. EnsEMBL – referência EnsEMBL, Gene – nome atribuído via EnsEMBL, Cromossoma – cromossoma (chr) onde se localiza o gene; logFC – logaritmo de base 2 do *fold change* em células HuH-7 transfectadas com pSVL(D3) face a células HuH-7 não transfectadas; *p-value* – valor probabilístico associado, corrigido com FDR.

EnsEMBL	Gene	Cromossoma	logFC	<i>p-value</i>
ENSG00000251448	RP11-71E19.2	chr3	-1,657	0,071
ENSG00000187786	SCXB	chr8	-1,200	0,071
ENSG00000170890	PLA2G1B	chr12	-1,099	0,082
ENSG00000188686	SCXA	chr8	-1,016	0,041
ENSG00000271824	SMIM32	chr5	-0,821	0,096
ENSG00000249992	TMEM158	chr3	-0,743	0,057
ENSG00000116882	HAO2	chr1	-0,656	0,011
ENSG00000196620	UGT2B15	chr4	-0,625	0,023
ENSG00000130528	HRC	chr19	-0,617	0,082
ENSG00000066468	FGFR2	chr10	-0,610	0,003
ENSG00000160870	CYP3A7	chr7	-0,566	0,004
ENSG00000130427	EPO	chr7	-0,549	0,071
ENSG00000186399	GOLGA8R	chr15	-0,540	0,083
ENSG00000010932	FMO1	chr1	-0,523	0,025
ENSG00000185669	SNAI3	chr16	-0,514	0,079
ENSG00000227051	C14orf132	chr14	-0,497	0,023
ENSG00000146674	IGFBP3	chr7	-0,441	0,071
ENSG00000021826	CPS1	chr2	-0,438	0,078
ENSG00000140284	SLC27A2	chr15	-0,413	0,018
ENSG00000137834	SMAD6	chr15	-0,409	0,048
ENSG00000205754	SLCO1B7	chr12	-0,409	0,009
ENSG00000137877	SPTBN5	chr15	-0,385	0,080
ENSG00000187045	TMPRSS6	chr22	-0,384	0,071
ENSG00000112964	GHR	chr5	-0,382	0,025
ENSG00000111700	SLCO1B3	chr12	-0,356	0,017
ENSG00000135127	BICDL1	chr12	-0,353	0,060
ENSG00000197893	NRAP	chr10	-0,348	0,060
ENSG00000141524	TMC6	chr17	-0,348	0,059
ENSG00000257046	AC011604.2	chr12	-0,340	0,023
ENSG00000148702	HABP2	chr10	-0,340	0,000
ENSG00000214049	UCA1	chr19	-0,339	0,042
ENSG00000157087	ATP2B2	chr3	-0,336	0,000
ENSG00000260630	SNAI3-AS1	chr16	-0,335	0,096
ENSG00000162391	FAM151A	chr1	-0,322	0,012
ENSG00000128311	TST	chr22	-0,316	0,016
ENSG00000106665	CLIP2	chr7	-0,313	0,016
ENSG00000118946	PCDH17	chr13	-0,308	0,080
ENSG00000267954	AP000349.1	chr22	-0,304	0,095
ENSG00000148180	GSN	chr9	-0,304	0,010
ENSG00000146966	DENND2A	chr7	-0,300	0,042
ENSG00000149809	TM7SF2	chr11	-0,294	0,017
ENSG00000162390	ACOT11	chr1	-0,293	0,080
ENSG00000115457	IGFBP2	chr2	-0,292	0,071
ENSG00000135747	ZNF670	chr1	-0,292	0,032
ENSG00000137161	CNPY3	chr6	-0,286	0,078
ENSG00000171345	KRT19	chr17	-0,284	0,034
ENSG00000148965	SAA4	chr11	-0,276	0,061
ENSG00000099953	MMP11	chr22	-0,269	0,086
ENSG00000169562	GJB1	chrX	-0,268	0,032

Ensembl	Gene	Cromossoma	logFC	p-value
ENSG00000255071	SAA2-SAA4	chr11	-0,268	0,071
ENSG00000170801	HTRA3	chr4	-0,266	0,080
ENSG00000160211	G6PD	chrX	-0,264	0,080
ENSG00000145321	GC	chr4	-0,263	0,061
ENSG00000173599	PC	chr11	-0,259	0,061
ENSG00000196739	COL27A1	chr9	-0,259	0,083
ENSG00000165272	AQP3	chr9	-0,257	0,089
ENSG00000184164	CRELD2	chr22	-0,252	0,071
ENSG00000214530	STARD10	chr11	-0,252	0,063
ENSG00000171227	TMEM37	chr2	-0,243	0,083
ENSG00000167711	SERPINF2	chr17	-0,243	0,061
ENSG00000198736	MSRB1	chr16	-0,234	0,080
ENSG00000227050	RP11-460I13.2	chr1	-0,233	0,100
ENSG00000170581	STAT2	chr12	-0,228	0,080
ENSG00000116774	OLFML3	chr1	-0,224	0,091
ENSG00000105647	PIK3R2	chr19	-0,222	0,060
ENSG00000127831	VIL1	chr2	-0,219	0,018
ENSG00000063854	HAGH	chr16	-0,217	0,098
ENSG00000110169	HPX	chr11	-0,211	0,061
ENSG00000174827	PDZD1	chr1	-0,199	0,060
ENSG00000060971	ACAA1	chr3	-0,192	0,066
ENSG00000204262	COL5A2	chr2	-0,191	0,063
ENSG00000130768	SMPDL3B	chr1	-0,189	0,096
ENSG00000179918	SEPHS2	chr16	-0,185	0,060
ENSG00000196975	ANXA4	chr2	-0,178	0,088
ENSG00000198646	NCOA6	chr20	0,173	0,100
ENSG00000138592	USP8	chr15	0,188	0,088
ENSG00000221823	PPP3R1	chr2	0,192	0,092
ENSG00000157514	TSC22D3	chrX	0,192	0,060
ENSG00000105835	NAMPT	chr7	0,194	0,083
ENSG00000185650	ZFP36L1	chr14	0,197	0,085
ENSG00000115904	SOS1	chr2	0,204	0,080
ENSG00000101782	RIOK3	chr18	0,211	0,023
ENSG00000161813	LARP4	chr12	0,215	0,096
ENSG00000134690	CDCA8	chr1	0,216	0,096
ENSG00000049449	RCN1	chr11	0,221	0,080
ENSG00000126775	ATG14	chr14	0,228	0,098
ENSG00000122435	TRMT13	chr1	0,228	0,096
ENSG00000184661	CDCA2	chr8	0,235	0,096
ENSG00000103460	TOX3	chr16	0,243	0,060
ENSG00000174749	FAM241A	chr4	0,245	0,063
ENSG00000236287	ZBED5	chr11	0,251	0,092
ENSG00000204842	ATXN2	chr12	0,251	0,048
ENSG00000160352	ZNF714	chr19	0,255	0,083
ENSG00000113369	ARRDC3	chr5	0,256	0,002
ENSG00000119707	RBM25	chr14	0,257	0,081
ENSG00000090470	PDCD7	chr15	0,261	0,098
ENSG00000205189	ZBTB10	chr8	0,261	0,047
ENSG00000114796	KLHL24	chr3	0,262	0,063
ENSG00000116954	RRAGC	chr1	0,267	0,047
ENSG00000162601	MYSM1	chr1	0,269	0,023
ENSG00000114120	SLC25A36	chr3	0,277	0,048
ENSG00000254004	ZNF260	chr19	0,279	0,087
ENSG00000092140	G2E3	chr14	0,286	0,048
ENSG00000173276	ZBTB21	chr21	0,286	0,017

Ensembl	Gene	Cromossoma	logFC	p-value
ENSG00000060749	QSER1	chr11	0,287	0,025
ENSG00000102786	INTS6	chr13	0,294	0,096
ENSG00000104427	ZC2HC1A	chr8	0,301	0,063
ENSG00000183386	FHL3	chr1	0,302	0,080
ENSG00000162613	FUBP1	chr1	0,302	0,004
ENSG00000182963	GJC1	chr17	0,306	0,047
ENSG00000140534	TICRR	chr15	0,307	0,085
ENSG00000135842	FAM129A	chr1	0,317	0,010
ENSG00000143079	CTTNBP2NL	chr1	0,326	0,029
ENSG00000116741	RGS2	chr1	0,327	0,063
ENSG00000175105	ZNF654	chr3	0,335	0,061
ENSG00000136492	BRIP1	chr17	0,335	0,018
ENSG00000143190	POU2F1	chr1	0,339	0,063
ENSG00000141034	GID4	chr17	0,353	0,077
ENSG00000189007	ADAT2	chr6	0,358	0,060
ENSG00000205595	AREGB	chr4	0,359	0,007
ENSG00000108256	NUFIP2	chr17	0,370	0,007
ENSG00000183864	TOB2	chr22	0,371	0,053
ENSG00000109321	AREG	chr4	0,383	0,009
ENSG00000113240	CLK4	chr5	0,389	0,061
ENSG00000163376	KBTBD8	chr3	0,397	0,066
ENSG00000121931	LRIF1	chr1	0,414	0,004
ENSG00000180626	ZNF594	chr17	0,421	0,037
ENSG00000232811	RP11-96K19.2	chr1	0,422	0,042
ENSG00000162616	DNAJB4	chr1	0,435	0,004
ENSG00000070669	ASNS	chr7	0,452	0,000
ENSG00000115840	SLC25A12	chr2	0,453	0,017
ENSG00000241073	RP4-714D9.2	chr1	0,469	0,061
ENSG00000132002	DNAJB1	chr19	0,485	0,046
ENSG00000113739	STC2	chr5	0,521	0,000
ENSG00000013441	CLK1	chr2	0,528	0,004
ENSG00000175697	GPR156	chr3	0,555	0,080
ENSG00000173275	ZNF449	chrX	0,570	0,018
ENSG00000168209	DDIT4	chr10	0,721	0,001
ENSG00000273188	AL022328.3	chr22	0,739	0,100
ENSG00000269926	DDIT4-AS1	chr10	0,746	0,001
ENSG00000170345	c-fos	chr14	0,783	0,007
ENSG00000202252	SNORD14C	chr11	0,826	0,096
ENSG00000262165	AC233723.1	chr17	0,860	0,060
ENSG00000128965	CHAC1	chr15	0,949	0,000
ENSG00000270681	AC095055.1	chr4	1,093	0,006
ENSG00000229639	RP3-380B4.1	chr1	1,292	0,090
ENSG00000173432	SAA1	chr11	1,312	0,027
ENSG00000272010	AC100814.1	chr8	1,559	0,003
ENSG00000238387	snoU13	chr11	1,628	0,010
ENSG00000250068	RP11-576C12.1	chr9	1,675	0,096
ENSG00000259038	AL121820.2	chr14	1,837	0,009
ENSG00000252213	SNORA74D	chr5	2,237	0,071
ENSG00000201003	SNORA58	chr1	3,107	0,014

Dos 153 genes identificados como diferencialmente expressos, é possível observar que estes se encontram em todos os cromossomas humanos excepto no cromossoma sexual

Y. Para além disso observa-se que o logFC varia entre -1,657 e +3,107, identificando-se tanto RNAs codificantes como RNAs não codificantes.

Uma das formas existentes para analisar dados de sequenciação de RNA consiste em estudos de *Gene Ontology* que permitem agrupar os genes conforme um vocabulário previamente designado (Ashburner *et al.*, 2000). Para tal, recorreu-se à aplicação *web* GOrilla (Eden *et al.*, 2009) com recurso à opção “*Single ranked list of genes*”, onde os genes discriminados na tabela 3.1 foram ordenados pelo valor absoluto do seu logFC em ordem decrescente. Foi possível associar 114 genes dos acima indicados a termos *Gene Ontology*. Os principais processos biológicos associados a esses genes, com *p-value* inferior a 0,1, encontram-se na tabela 3.2. Este *p-value* é computado de acordo com modelos hipergeométricos, sendo depois corrigido com FDR para múltiplos testes.

Tabela 3.2: Termos *Gene Ontology* representados no conjunto de genes resultantes do RNA-seq. Na tabela são apresentados os termos de *Gene Ontology*, representados nos genes diferencialmente expressos conforme o RNA-seq, com FDR inferior a 0,1.

Termo <i>Gene Ontology</i>	Descrição	FDR
GO:0002793	Regulação positiva das secreções de péptidos	0,098
GO:0030595	Quimiotaxia de leucócitos	0,086
GO:0030593	Quimiotaxia de neutrófilos	0,076
GO:1990266	Migração de neutrófilos	0,069
GO:0050714	Regulação positiva das secreções de proteínas	0,063
GO:1903532	Regulação positiva das secreções celulares	0,057
GO:0042330	Taxia	0,053
GO:0051047	Regulação positiva das secreções	0,049
GO:0007204	Regulação positiva da concentração sistólica de íões cálcio	0,046
GO:0051222	Regulação positiva do transporte de proteínas	0,043
GO:0097529	Migração de leucócitos mielóides	0,040
GO:0097530	Migração de granulócitos	0,038
GO:0060326	Quimiotaxia celular	0,036
GO:0051924	Regulação do transporte de íões cálcio	0,039
GO:0040011	Locomoção	0,044
GO:0016477	Migração celular	0,042
GO:0048870	Motilidade celular	0,040
GO:0071902	Regulação positiva da actividade da cinase serina/treonina	0,073
GO:1904951	Regulação positiva de estabelecimento de localização proteica	0,070
GO:0043406	Regulação positiva da MAP	0,067
GO:0002791	Regulação das secreções de péptidos	0,064
GO:0050708	Regulação das secreções de proteínas	0,062
GO:0050900	Migração dos leucócitos	0,060
GO:1903530	Regulação das secreções celulares	0,058
GO:0051046	Regulação das secreções	0,056
GO:0051050	Regulação positiva do transporte	0,054
GO:0051223	Regulação do transporte proteico	0,053
GO:0090087	Regulação do transporte de péptidos	0,051
GO:0000187	Activação da MAPK	0,050

É possível notar a existência de processos ligados à resposta imune, assim como regulação metabólica e resposta a estímulos. Naturalmente muitos destes processos encontram-se interligados, e o GOrilla providencia um gráfico ilustrando essas ligações (anexo I) que permite mais facilmente a compreensão dos termos *Gene Ontology* e a sua importância para a célula.

Na procura de termos *Gene Ontology* para funções moleculares e componentes celulares, não nos foi possível identificar termos com *p-value* significativo. Para tal, seria necessário um maior número de genes, ou recorrer à função do GOrilla “*Two unranked lists of genes*” em que a lista de genes diferencialmente expressa é toda ela comparada com uma lista de referência do genoma em estudo.

3.2.1 Validação do RNA seq

Com o intuito de validar os resultados do RNA-seq, a partir do RNA total extraído de células HuH-7 não transfectadas e de células HuH-7 transfectadas com 1µg de pSVL(D3) efectuou-se transcrição reversa para cDNA e PCRs com recurso a *primers* específicos para diversos genes contidos na tabela 3.1, de alguma forma relacionados com processos oncogénicos e/ou com o desenvolvimento do fígado. Após electroforese em gel de agarose a 2% obtiveram-se os resultados apresentados na figura 3.5 para os genes com logFC positivo, correspondentes a genes cuja expressão era expectável que fosse superior nas células transfectadas com pSVL(D3). Na figura 3.6 encontram-se por sua vez os resultados das electroforeses correspondentes aos genes analisados com logFC negativo, portanto onde seria expectável uma maior expressão nas células controlo. O gene U6 foi utilizado como gene *housekeeping* e uma vez que este apresenta igual expressão em ambas as condições experimentais, foi possível a validação dos restantes resultados. Os genes analisados foram c-fos (logFC: +0,783) já descrito como sobre-expresso em carcinoma hepatocelular relacionado com HCV (Watanabe *et al.*, 2013); LRIF1 (logFC: +0,414) com importância descrita em cancro pancreático (GursesCila *et al.*, 2016); ATXN2 (logFC: + 0,251) relacionado com a estabilização de determinados mRNAs e consequente aumento da sua expressão proteica (Yokoshi *et al.*, 2014); HAO2 (logFC: - 0,656) descrito como sobre-expresso em HCC (Mattu *et al.*, 2016); FGFR2 (logFC: - 0,610) cujo aumento de expressão está relacionado com uma menor diferenciação celular em HCC (Harimoto *et al.*, 2010); FMO1 (logFC: -0,523) expresso no fígado humano

apenas durante o período fetal (Koukouritaki *et al.*, 2002); Smad6 (logFC: -0,409) descrito como supressor de crescimento em células hepáticas (Ding *et al.*, 2014) e GJB1 (logFC: -0,268) normalmente subexpresso em HCC, com contribuição para a proliferação e formação de metástases (Zhao *et al.*, 2015).

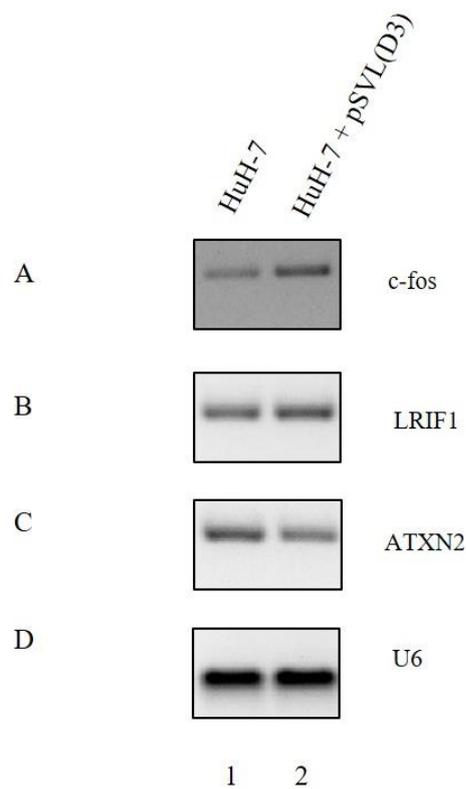


Figura 3.5: Níveis de expressão dos transcritos de genes seleccionados com logFC positivo. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Paineil A: c-fos (logFC: +0,783); Paineil B: LRIF1 (logFC: +0,414); Paineil C: ATXN2 (logFC: +0,251); Paineil D: U6 (gene *housekeeping*).

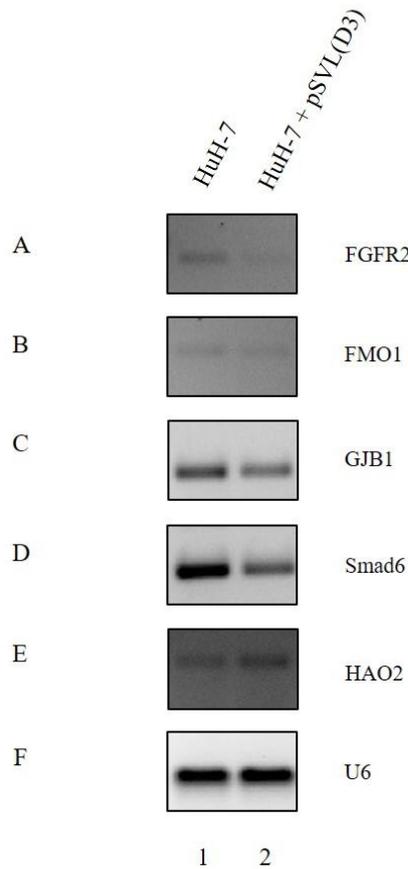


Figura 3.6: Níveis de expressão dos transcritos de genes seleccionados com logFC negativo. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Painei A: FGFR2 (logFC: -0,610); Painei B: FMO1 (logFC: -0,523); Painei C: GJB1 (logFC: -0,268); Painei D: Smad6 (logFC: -0,409); Painei E: HAO2 (logFC: 0,656); Painei F: U6 (gene *housekeeping*).

Foi possível validar os resultados do RNA-seq numa taxa de 75%, um valor próximo do encontrado na literatura recente (Vigevani *et al.*, 2017). Os genes *c-fos*, *LRIF1*, *FGFR2*, *FMO1*, *GJB1* e *Smad6* foram validados, uma vez que foi observada a alteração da expressão no sentido previsto pelo RNA-seq, enquanto que nos casos dos genes *ATXN2* e *HAO2* a validação não foi possível, pois estes genes apresentaram alterações de expressão no sentido oposto ao indicado pelos dados resultantes do RNA-seq.

3.3 Alterações na expressão dos componentes do factor AP-1 induzidas pela infecção por HDV

De entre os genes cujo resultado do RNA-seq foi validado por PCR, decidimos focar o trabalho no gene *c-fos*. O gene *c-fos* é o homólogo humano do oncogene retroviral *v-fos* (Van Straaten *et al.*, 1983), encontrando-se no cromossoma 14, possuindo 4 exões e é traduzido numa proteína de 380 aminoácidos, com peso molecular de 40 kDa. Este gene é expresso em diversos tecidos humanos, nomeadamente no fígado, e encontra-se associado a diversos processos celulares, como seja a proliferação e diferenciação celular. O gene *c-fos* faz parte da família FOS juntamente com os genes FosB, Fra1 e Fra2. Os genes desta família, em conjunto com os genes da família JUN, compreendida pelos genes *c-jun*, *junB* e *junD* são os principais componentes do factor de transcrição dimérico AP-1 (proteína activadora 1).

Todas as proteínas que integram o AP-1 possuem um domínio *zipper* básico de leucina, essencial para a dimerização e para a ligação ao DNA. O AP-1 tem sido largamente estudado de forma a perceber o seu papel na proliferação e transformação celular e a sua acumulação foi implicada também na inflamação, diferenciação, apoptose e migração celular (Shaulian & Karin, 2002; Hess *et al.*, 2004).

Ao contrário das proteínas da família JUN, os membros da família FOS não formam homodímeros, e ao formarem heterodímeros com proteínas de outra família originam complexos com diferentes propriedades bioquímicas (Milde-Langosch, 2005). Estudos *in vitro* mostram que os heterodímeros FOS-JUN são mais estáveis e possuem uma maior capacidade de ligação ao DNA do que homodímeros JUN-JUN (Halazonetis *et al.*, 1988; Ryseck & Bravo, 1991).

De forma a saber se a diferença de expressão observada em *c-fos* aquando da expressão de todos os componentes do HDV em células HuH-7 não seria de certa forma compensada por outro gene da família FOS ou da família JUN, decidimos explorar se existiriam alterações da expressão nos restantes genes destas famílias aquando da infecção por HDV. Para tal, foram feitas PCR com recurso a *primers* para cada um dos genes das famílias FOS e JUN (FosB, Fra1, Fra2, *c-jun*, *junB* e *junD*) e seguinte resolução em electroforese de gel de agarose. Como é possível observar nas figuras 3.7 e 3.8, mais nenhum gene destas duas famílias apresentou alterações na expressão dos transcritos aquando da transfecção com pSVL(D3), pelo que possíveis alterações em genes regulados

pelo factor de transcrição AP-1 serão muito provavelmente devidas à sobre-expressão do gene *c-fos* (painel A da figura 3.7).

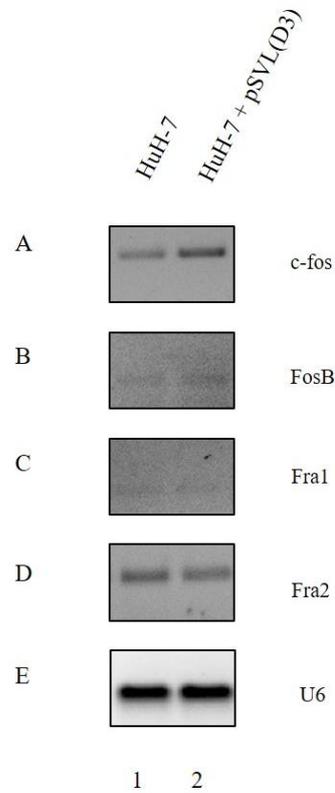


Figura 3.7: Níveis de expressão dos transcritos dos genes da família FOS. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Painel A: *c-fos*; Painel B: FosB; Painel C: Fra1; Painel D: Fra2; Painel E: U6 (gene *housekeeping*)

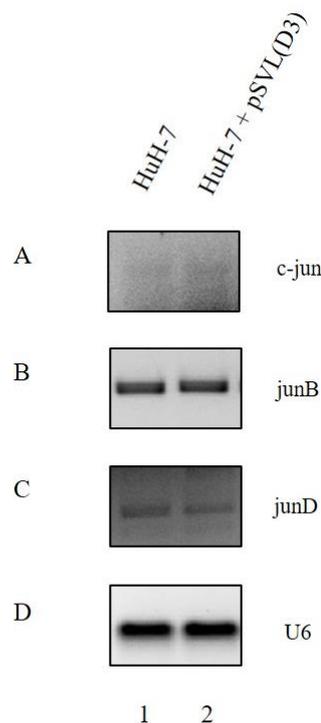


Figura 3.8: Níveis de expressão dos transcritos dos genes da família JUN. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Paineis: A: c-jun; B: junB; C: junD; D: U6 (gene *housekeeping*)

De seguida decidimos analisar se existiria um componente do ciclo replicativo do HDV maioritariamente responsável pela alteração da expressão de c-fos durante a infecção por HDV. Como descrito no capítulo 1.1.2 durante a infecção por HDV é possível detectar nos hepatócitos infectados não só o seu genoma, mas também um intermediário de replicação denominado anti-genoma, assim como ambas as formas do antígeno delta, S-HDAg e L-HDAg. Para identificar o efeito de cada componente foram efectuadas diversas transfecções em células HuH-7 com recurso a plasmídeos que apenas expressam cada um dos componentes do HDV isoladamente (Tavanez *et al.*, 2002). Após 24 horas foi extraído RNA total, transcrito para cDNA e efectuada PCR com recurso a *primers* para o gene c-fos, de células HuH-7 transfectadas com um plasmídeo que apenas expressa o anti-genoma do HDV (pDL481) (Figura 3.9), de células HuH-7 transfectadas com um plasmídeo que apenas expressa o genoma do HDV (pDL542) (Figura 3.10), e de células HuH-7 transfectadas com plasmídeos que expressam ambas as formas do antígeno delta (pSVL-S-HDAg e pSVL-L-HDAg) (Figura 3.11).

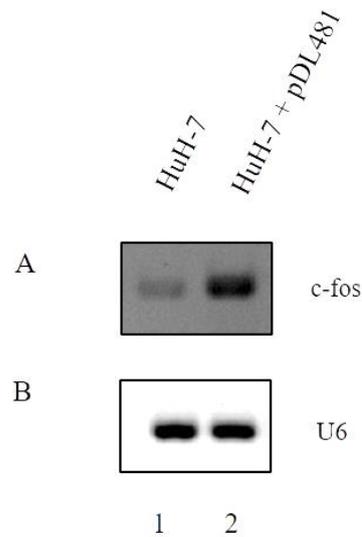


Figura 3.9: Níveis de expressão de c-fos após transfecção com pDL481. Aumento da expressão do transcrito de c-fos após transfecção com plasmídeo que apenas expressa o anti-genoma do HDV. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 μ g de pDL481. Painel A: c-fos; Painel B: U6 (gene *housekeeping*)

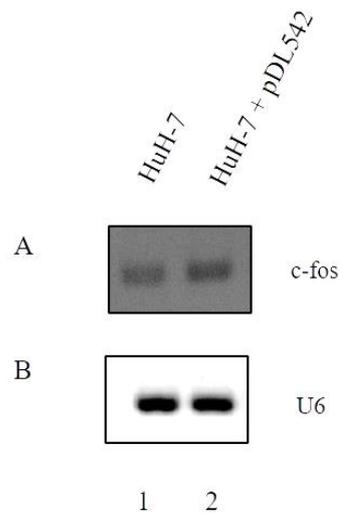


Figura 3.10: Níveis de expressão de c-fos após transfecção com pDL542. Aumento da expressão do transcrito de c-fos após transfecção com plasmídeo que apenas expressa o genoma do HDV. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 μ g de pDL542. Painel A: c-fos; Painel B: U6 (gene *housekeeping*)

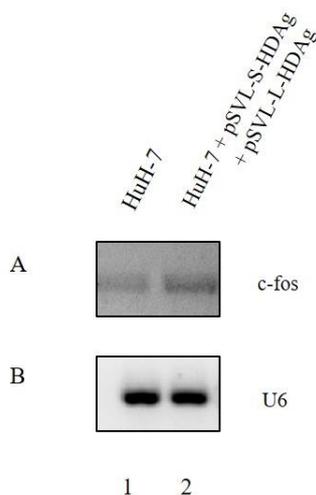


Figura 3.11: Níveis de expressão de c-fos após transfecção com pSVL-S-HDAg e pSVL-L-HDAg. Aumento da expressão do transcrito de c-fos após transfecção com plasmídeos que expressam ambas as formas do antígeno delta. Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL-S-HDAg e 1µg de pSVL-L-HDAg. Painel A: c-fos; Painel B: U6 (gene *housekeeping*)

Tal como foi visível durante a transfecção com pSLV(D3) (painel A da figura 3.5), também cada componente do HDV por si só promove o aumento da expressão do gene c-fos, sendo que o anti-genoma (painel A da figura 3.9) parece ser o componente que isoladamente é capaz de induzir um maior aumento da expressão do gene c-fos.

3.3.1 Aumento da expressão de c-fos induzida por HDV conduz a um aumento da expressão da ciclina D1

Um dos genes que se encontra descrito na literatura (Albanese *et al.*, 1995; Klein & Assoian, 2008) como regulado pelo AP-1 é a ciclina D1 (CCND1), cuja sobre-expressão leva à progressão do ciclo celular e proliferação de células cancerígenas (Shen *et al.*, 2008).

Existem 3 ciclinas D (D1, D2 e D3) que funcionam de modo coordenado como reguladores alostéricos de cinases dependentes de ciclinas (cdk), nomeadamente da cdk4 e da cdk 6, regulando assim a transição do ciclo celular da fase G1 para a fase S, através da fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) (Kato & Sherr, 1993). A ciclina D1 está associada com a actividade de factores de transcrição, co-activadores e co-repressores que determinam a acetilação de histonas e proteínas remodeladoras da cromatina (Fu *et al.*, 2004). É interessante referir que não só o promotor do gene da ciclina D1 contém um

local consenso para o factor de transcrição AP-1 (Herber *et al.*, 1994; Albanese *et al.*, 1995; Klein & Assoian 2008; Shen *et al.*, 2008;), mas que esta ciclina é também encontrada mais expressa em células que sobre-expressem o gene c-fos (Güller *et al.*, 2008).

Tendo em conta a relação descrita entre o gene c-fos e a ciclina D1, decidimos verificar quais seriam os níveis de expressão da ciclina D1 em células HuH-7 após a transfecção com pSVL(D3). Na figura 3.12 observa-se um aumento da expressão do transcrito de ciclina D1 nas células HuH-7 que foram transfectadas com pSVL(D3) face às células não transfectadas, concordante com o resultado anterior, onde células expressando todos os componentes do HDV apresentavam uma sobre-expressão do transcrito de c-fos (painel A da figura 3.5).

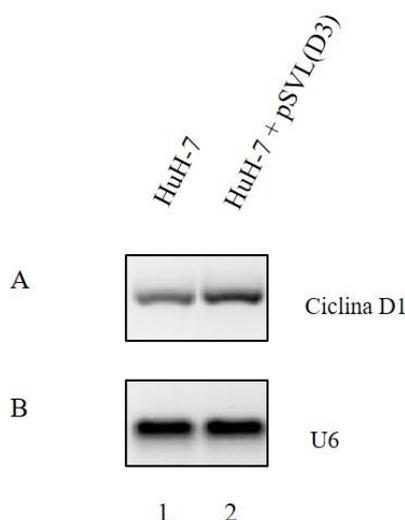


Figura 3.12: Níveis de expressão do transcrito de ciclina D1 após transfecção com pSVL(D3). Linha 1: células HuH-7 não transfectadas; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 1 µg de pSVL(D3). Painel A: ciclina D1; Painel B: U6 (gene *housekeeping*).

Para analisar o papel do gene c-fos na promoção das alterações da expressão observadas na ciclina D1, decidimos fazer RNAi em células HuH-7 com recurso a oligos de siRNA específicos para c-fos. O processo de RNAi é um mecanismo fundamental nas células eucariotas, através do qual siRNAs com especificidade de sequência são capazes de seleccionar e clivar mRNA complementares, conduzindo à sua degradação (Elbashir *et al.*, 2001). Este processo é desencadeado pela presença de longas moléculas de RNA de cadeia dupla, que são então clivadas pela enzima Dicer (Bernstein *et al.*, 2001).

Desta maneira, de forma a alcançar uma diminuição dos níveis do transcrito de c-fos, células HuH-7 foram transfectadas com oligos de siRNA específicos para c-fos. Após um total de 72 horas de RNAi, o RNA total foi extraído e após transcrição para cDNA, foi efectuada PCR com recurso a *primers* para o gene c-fos. É possível visualizar na figura 3.13 (painel A) uma diminuição da expressão do transcrito de c-fos aquando da transfecção com siRNAs de c-fos comparativamente às células controlo transfectadas com siRNAs específicos para o gene da luciferase. Por sua vez, observámos que os níveis do gene *housekeeping* U6 se mantêm inalterados em ambas as condições experimentais (painel B da figura 3.13).

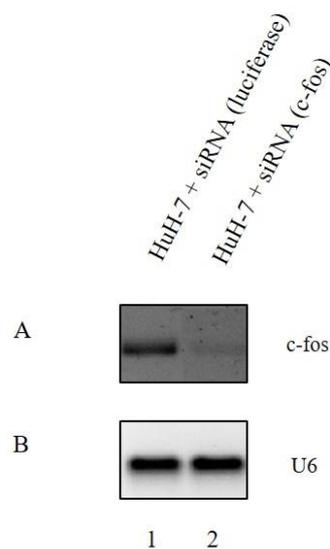


Figura 3.13: Níveis de expressão de c-fos após a transfecção com siRNAs de c-fos. Diminuição da expressão de c-fos após transfecção com siRNAs. Linha 1: células HuH-7 transfectadas com siRNA de luciferase; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 600 ng de siRNA de c-fos. Painel A: c-fos; Painel B: U6 (gene *housekeeping*).

Após a observação que a expressão do transcrito do gene c-fos diminuía com siRNAs específicos para o mesmo, decidimos analisar se a ciclina D1, cuja expressão observámos encontrar-se alterada após transfecção com pSVL(D3) (Figura 3.12, painel A) e cuja transcrição é regulada por c-fos/AP-1, também diminuiria nas células interferidas. No entanto, após a transfecção com siRNAs de c-fos em células HuH-7, os níveis de transcrito da ciclina D1 não parecem sofrer qualquer alteração (painel A da figura 3.14).

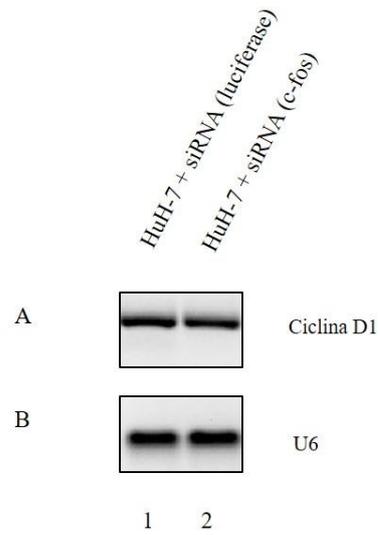


Figura 3.14: Níveis de expressão de ciclina D1 após a transfecção com siRNAs de c-fos. Linha 1: células HuH-7 transfectadas com siRNA de luciferase; Linha 2: células HuH-7 transfectadas com 600 ng de siRNA de c-fos. Painei A: ciclina D1; Painei B: U6 (gene *housekeeping*).

4. Discussão e Conclusões

O presente trabalho pretendeu aumentar o conhecimento sobre a influência do vírus da hepatite delta no processo de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, com recurso ao estabelecimento de um modelo de infecção por HDV, à técnica de sequenciação de RNA e a diversas técnicas de biologia molecular. Foi ainda explorada a influência do HDV na expressão do gene c-fos.

Apesar de ter sido identificado pela primeira vez há mais de 40 anos (Rizzetto *et al.*, 1977), o HDV ainda possui muitos aspectos desconhecidos dando por isso origem a diversos estudos na área da oncologia e na da biologia do RNA.

O HDV é o mais pequeno vírus conhecido que infecta o ser humano. Este possui um genoma de RNA, que consiste numa molécula circular com cerca de 1700 nucleótidos (Kos *et al.*, 1987). Porém, só é capaz de infectar novos hepatócitos na presença do vírus da hepatite B, uma vez que o invólucro do HDV é constituído pelos antígenos de superfície do HBV. Apesar da sua aparente simplicidade pensa-se que o HDV induza alterações em diversos mecanismos celulares, tornando-o capaz de causar a forma mais agressiva de hepatite viral (Botelho-Souza *et al.*, 2017). A replicação do vírus ocorre pelo método de círculo rolante, levando à formação de um intermediário de replicação denominado de anti-genoma (Taylor, 1992). É ainda transcrito um RNA mensageiro com a mesma polaridade do anti-genoma, que dá origem às duas formas do antígeno delta devido a uma modificação durante a transcrição. Enquanto que o S-HDAg tem um papel essencial para a contínua replicação do genoma do HDV, o L-HDAg reprime essa replicação, favorecendo por sua vez, o empacotamento das partículas virais através da interacção com os antígenos de superfície do HBV (Chang *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 1990).

Não obstante o facto de globalmente, cerca de 20 milhões de pessoas encontrarem-se cronicamente infectadas com o vírus da hepatite delta (Rizzetto & Ciancio, 2012), não existe actualmente um tratamento eficiente e específico que conduza à sua cura, devido à simplicidade do vírus e à existência de apenas um alvo (HDAg) sem função enzimática. Diversos fármacos têm sido testados, contudo os utilizados para o tratamento do HBV não são eficazes no tratamento da infecção por HDV e as terapêuticas dirigidas ao HDV actualmente disponíveis não possuem resultados satisfatórios, provocando diversos efeitos secundários severos. Por exemplo o fármaco mais utilizado é o IFN α que para

além de uma eficácia reduzida na diminuição do RNA viral no soro do doente, causa diversos efeitos secundários, nomeadamente a nível de alterações gastrointestinais, astenia, mialgias e vários sintomas psiquiátricos (Sleijfer *et al.*, 2005). Tendo em conta todas estas dificuldades é de maior importância que se continue a estudar e a desenvolver novos aspectos da biologia do vírus, que permitam contribuir para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Também pelo facto da infecção por HDV aumentar o risco do doente desenvolver carcinoma hepatocelular em cerca de 3 vezes em relação à infecção apenas por HBV (Fattovich *et al.*, 2000), torna-se considerável aumentar o conhecimento de quais as vias e processos celulares alterados pelo vírus.

Entre os diversos estudos que têm sido feitos de forma a perceber como é que o HDV interfere com o normal funcionamento das células estão os que descrevem alterações na via de sinalização JAK-STAT induzidas pelo HDV, os que descrevem alterações em eventos de metilação de DNA, ou mesmo alterações na acetilação das histonas (Pugnale *et al.*, 2009; Benegiamo *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2009). No entanto, nunca foi feita uma análise numa perspectiva genómica das alterações induzidas pelo HDV, motivando assim o presente trabalho que visou ser uma abordagem inicial à identificação das alterações globais induzidas pelo HDV no transcriptoma humano, através do uso de linhas celulares que expressam HDV e da técnica de sequenciação de RNA.

A técnica de RNA-seq foi um dos grandes avanços do fim da década passada, permitindo a compreensão de como células com o mesmo genoma possuem diferentes funções, através da sequenciação de todo o transcriptoma e da análise de genes diferencialmente expressos em diferentes condições (Wang *et al.*, 2009).

Antes do RNA-seq se tornar uma técnica de uso comum nos laboratórios, os estudos de transcriptoma eram maioritariamente efectuados com recurso a *microarrays*, utilizando sondas desenhadas para cada gene, aos quais os transcritos se ligam. Com o uso de sondas controlo é possível determinar a expressão de cada gene (Efron *et al.*, 2001). Após a introdução das novas técnicas de sequenciação, essas foram adaptadas para a análise de transcriptoma, surgindo o RNA-seq que se tornou a técnica mais utilizada actualmente (Kogenaru *et al.*, 2012). Uma das razões é que ao contrário dos *microarrays*, o RNA-seq não necessita de um conhecimento prévio do transcriptoma de referência. Para além disso, o RNA-seq é mais vantajoso pois tem capacidade para detectar níveis de expressão num

maior intervalo e a quantidade de RNA necessária é menor que a utilizada para uma experiência de *microarrays* (Raz *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Van Vilet, 2009).

Contudo, o RNA-seq também tem as suas desvantagens que podem influenciar os resultados, nomeadamente o excesso de RNA ribossomal, as *reads* serem demasiado pequenas, assim como a variação da densidade das *reads* ao longo do transcrito (Fu *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Martin & Wang, 2011).

Independentemente da selecção da técnica se basear no objectivo da experiência e nos meios disponíveis em cada laboratório, existe um consenso geral que ambas têm os seus prós e contras, e que se complementam (Kogenaru *et al.*, 2012).

A partir dos dados de RNA-seq, diferentes abordagens informáticas têm sido utilizadas para quantificar a expressão diferencial de genes entre duas ou mais amostras levando à produção de resultados que nem sempre são reproduzíveis em amostras similares. Num estudo onde foram utilizados diferentes métodos, o edgeR mostrou ser bastante sensível e específico (Rajkumar *et al.*, 2015), ao contrário de outros métodos bastante utilizados (Cuffdiff2, DESeq2 e TSPM). Para além disso, o facto deste pacote funcionar em ambiente R (de livre acesso) torna-o mais acessível para a maioria dos laboratórios.

Para analisar o elevado número de dados gerados neste tipo de experiências, foram produzidas novas ferramentas, uma das quais é o vocabulário criado para *Gene Ontology* (Ashburner *et al.*, 2000) que permite agilizar a interpretação dos resultados. A identificação dos termos associados a processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares, sobre-representados numa determinada amostra, permite esclarecer mais facilmente a sua condição do que apenas uma lista de genes (Eden *et al.*, 2009).

Para a execução deste trabalho foi necessário estabelecer um modelo de infecção pelo vírus da hepatite delta *in vitro*, tal foi possível através da transfecção com o plasmídeo pSVL(D3) em células da linha celular HuH-7. Este plasmídeo contém 3 cópias de cDNA do genoma do HDV no vector de expressão pSVL levando à expressão de todos os componentes do ciclo replicativo do vírus, isto é, o genoma, o anti-genoma e ambas as formas do antigénio delta (Kuo *et al.*, 1989). Após extracção do RNA total de células transfectadas e de células controlo procedeu-se à sua sequenciação, identificando os genes diferencialmente expressos.

Com a execução do RNA-seq, foi-nos possível detectar mais de uma centena de genes cujos transcritos se encontram diferencialmente expressos nas duas condições experimentais. Estes genes estão associados particularmente a processos de resposta imune e regulação metabólica. A explicação mais simples é que na presença dos componentes associados ao ciclo replicativo do HDV a célula tenta produzir uma resposta imune inata. Por sua vez, o metabolismo da célula é uma das suas funções essenciais, formando uma complexa rede que durante o processo cancerígeno se encontra bastante alterado, dado que células em proliferação têm uma maior necessidade de nutrientes e energia (Cairns *et al.*, 2011; DeBerardinis *et al.*, 2008).

Tendo em conta o elevado número de genes diferencialmente expressos identificados, foi primeiramente efectuada uma validação dos resultados do RNA-seq através de PCRs de genes relacionados com oncogénese e/ou desenvolvimento hepático. Isto permitiu-nos obter uma boa taxa de validação do RNA-seq, mas também identificar o proto-oncogene *c-fos* como sobre-expresso na situação experimental de infecção por HDV, pelo que se decidiu analisar as alterações da expressão deste gene com mais detalhe.

O gene *c-fos* codifica para um importante factor de transcrição em células eucariotas, podendo induzir a transcrição e expressão proteica de diversos genes alvo, assim como a regulação da proliferação, migração celular e apoptose. A sua sobre-expressão pode intervir no equilíbrio normal da proliferação celular induzindo a transformação celular e a formação de tumores (Zhao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Para além disso, a sobre-expressão de *c-fos* está ainda descrita como responsável pela diminuição da expressão de genes supressores tumorais, assim como pelo crescimento invasivo das células cancerígenas. A expressão de *c-fos* pode também induzir a perda da polaridade celular e a transição epitelial-mesenquimatosa o que se exprime num crescimento invasivo e metastático (Bakin & Curran, 1999; Hu *et al.*, 1994; Fialka *et al.*, 1996; Eferl & Wagner, 2003).

Em carcinoma hepatocelular existem descrições da sobre-expressão de *c-fos*, assim como em diversos outros cancros, como mamário, colorrectal, endometrial, renal, osteossarcoma e de células da cabeça e pescoço (Yuen *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2013; Milde-Langosh, 2004; Ashida *et al.*, 2005; Bamberger *et al.*, 2001; Hirata *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 1991; Muhammad *et al.*, 2017). Não obstante, existem também descrições

de c-fos se encontrar subexpresso em certos cancros, casos do cancro do ovário, de pulmão de células-não-pequenas, da tiróide e gástrico (Mahner *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2007).

O gene c-fos foi ainda descrito como possuindo um papel importante no aumento dos níveis de espécies reactivas de oxigénio. Este facto merece especial atenção uma vez que recentemente o L-HDAg foi identificado como possível responsável pelo aumento dos níveis de ROS, num modelo celular compatível com a infecção por HDV, através da indução de Nox4 (Mikula *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2012). Uma vez que nós observámos a sobre-expressão de c-fos aquando da expressão de todos os componentes do HDV, será interessante no futuro perceber se essa sobre-expressão está relacionada com o aumento de ROS já descrito em infecções por HDV, podendo ser mais um mecanismo a contribuir para o aumento do *stress* oxidativo nestas infecções.

Por último, existe ainda uma interessante relação entre o gene c-fos e o vírus da hepatite C, uma vez que não só nos casos de infecção por HCV existe um aumento dos níveis de expressão de c-fos, mas também essa sobre-expressão de c-fos parece aumentar a capacidade de propagação do vírus da hepatite C (Kang *et al.*, 2011).

É importante referir que o gene c-fos é um dos constituintes do factor AP-1. O AP-1 é um factor de transcrição dimérico, constituído por proteínas que possuem um domínio *zipper* básico de leucina para ligação ao DNA, e importante para a proliferação e transformação celular, encontrando-se ainda descrito como participante em diversas vias de sinalização celular (Shaulian & Karin, 2002). As proteínas mais frequentes no AP-1 são as pertencentes às famílias FOS (c-fos, FosB, Fra1 e Fra2) e JUN (c-jun, junB e junD), mas proteínas do factor de transcrição activador (ATF) (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 e JDP2) também podem integrar o AP-1 (Shaulian, 2010), assim como a não tão estudada subfamília Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K e Nrl) (Eychène *et al.*, 2008).

Uma particularidade das proteínas da família FOS é a sua incapacidade de dimerizar entre si formando por isso heterodímeros, normalmente com elementos da família JUN, sendo que c-fos/c-jun constituem o prototípico AP-1 (Gustems *et al.*, 2013). Após a dimerização de c-fos com um elemento de outra família para a formação do AP-1, este liga-se a uma sequência consenso conhecida como elemento responsivo a TPA (TRE) no promotor de genes alvo (Milde-Langosch, 2005). No entanto, é conhecido que se o factor AP-1

contiver diferentes constituintes, este poderá ligar-se a diferentes sequências (Shaulian, 2010). Em relação à formação do AP-1 é ainda de realçar que estudos recentes *in vitro*, indicam a existência de homodímeros de c-fos em tecidos tumorais, que poderão estar relacionados com o desenvolvimento do tumor (Szalóki *et al.*, 2015).

Apesar do papel do AP-1 na tumorigénese poder ser de a promover ou de a suprimir dependendo do tipo celular, do seu estado de diferenciação e do estadio do tumor, assim como da composição do próprio dímero de AP-1, em tecidos de carcinoma hepatocelular o factor AP-1 encontra-se descrito como sobre-expresso face a tecidos não tumorais adjacentes, inclusive quando c-fos integra o AP-1 (Eferl & Wagner, 2003; Arbuthnot *et al.*, 1991; Yuen *et al.*, 2001). Existem ainda relatos de diversos genes virais, tanto do vírus da hepatite B como do vírus da hepatite C, que *in vitro*, funcionam de forma a activar o factor de transcrição AP-1 (Benn *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002). Por outro lado, a progressão de carcinoma hepatocelular devido a HBV, encontra-se relacionada com a expressão da citocina osteopontina, um dos genes alvo do AP-1 (Trierweiler *et al.*, 2016). Tendo em conta o facto de c-fos se encontrar num heterodímero para formar o AP-1, analisou-se os níveis de expressão dos restantes genes das famílias mais comuns deste factor através de diversas PCRs, de forma a garantir que as diferenças visíveis estariam relacionadas unicamente com o gene c-fos. Observámos que apenas c-fos tem uma alteração da sua expressão aquando da expressão de todos os componentes do HDV, o que nos leva a pensar que muito provavelmente quaisquer alterações visíveis em genes regulados por AP-1, durante a infecção por HDV, serão devidas ao aumento da expressão de c-fos e não dos outros genes integrantes no AP-1, o que poderá indicar a possibilidade do uso do gene c-fos como alvo terapêutico para infecções por HDV no futuro.

Depois de observarmos que a infecção por HDV induz o aumento da expressão de c-fos, analisou-se individualmente cada componente do ciclo replicativo do HDV, de forma a perceber se haveria um componente que fosse responsável pela sobre-expressão do gene c-fos. Para tal, foram feitas transfecções com plasmídeos que contêm cada um dos componentes do ciclo replicativo do HDV isoladamente, e observou-se que todos eles induziam a sobre-expressão de c-fos. Contudo o aumento mais pronunciado ocorreu com a transfecção com o plasmídeo pDL481, que conduz apenas à expressão do anti-genoma do HDV. A localização preferencial de RNA genómico e anti-genómico, quando

expressos isoladamente em experiências de transfecção transiente, pode ajudar a compreender este resultado (Tavanez *et al.*, 2002). Enquanto que o RNA anti-genómico se encontra distribuído de forma mais ou menos equitativa entre núcleo e citoplasma, o RNA genómico do HDV é detectado maioritariamente no citoplasma, o que pode justificar a menor capacidade do RNA genómico, quando transfectado isoladamente em células humanas, em influenciar a expressão do gene *c-fos*. Uma possível experiência para validar estes resultados, será a transfecção simultaneamente do pDL542 e dos plasmídeos de expressão de ambas as formas do antigénio delta em células HuH-7, o que tornaria possível o transporte do genoma para o núcleo da célula, uma vez que este é facilitado pela presença do HDAg, sendo assim possível verificar qual a influência do genoma do HDV para a expressão do gene *c-fos*. Por último, convém referir que num doente infectado por HDV todos os componentes são maioritariamente encontrados no núcleo (Tavanez *et al.*, 2002), pelo que estes resultados não nos permitem excluir a influência do genoma nas alterações da expressão do gene *c-fos*. Conseguir identificar qual o componente do HDV responsável pela sobre-expressão do gene *c-fos*, poderia nos permitir uma melhor compreensão de como essa alteração de expressão acontece.

Um dos genes descritos como alvo de regulação por *c-fos*/AP-1 é a ciclina D1, a qual regula a transição no ciclo celular da fase G1 para a fase S (Kato & Sherr, 1993) e cuja expressão é controlada a diferentes níveis, incluindo transcrição, estabilidade da proteína e localização intracelular (Tashiro *et al.*, 2007). A ciclina D1 encontra-se mais expressa em células que sobre-expressam *c-fos*, bem como em situações de carcinoma hepatocelular (Güller *et al.*, 2008; Joo *et al.*, 2001). De realçar que é necessário que *c-fos* esteja presente no dímero AP-1 para que a ciclina D1 seja transcrita (Tulchinsky, 2000). Adicionalmente a acumulação nuclear da ciclina D1 leva a uma progressão descontrolada do ciclo celular, devido à capacidade da ciclina D1 inactivar a proteína Rb. Contudo a exportação nuclear da ciclina D1 é constitutiva e a sua destruição por mecanismos dependentes de ubiquitinação impedem essa acumulação (Alt *et al.*, 2000; Qie & Diehl, 2016; Diehl, 2002). Os nossos resultados mostraram apenas que a expressão de todos os componentes do HDV em células humanas induz o aumento dos níveis de expressão do transcrito da ciclina D1, uma vez que não nos foi possível analisar os níveis de expressão da sua proteína e conseqüente acumulação nuclear desta. Porém os nossos resultados

levam-nos a considerar a hipótese de que o aumento observado da expressão da ciclina D1 aquando da presença do HDV possa levar à sua acumulação no núcleo e consequente progressão descontrolada do ciclo celular, o que por sua vez permitiria a evolução para a situação de carcinoma hepatocelular característica das infecções crónicas por HDV. Será interessante no futuro analisar esta hipótese, não só através da análise dos níveis da proteína da ciclina D1 aquando da transfecção de células HuH-7 com pSVL(D3) mas também com recurso a um protocolo de imunofluorescência com uso de anticorpos dirigidos à ciclina D1, permitindo a visualização da distribuição desta no interior da célula aquando da expressão de todos os componentes do HDV.

Com o objectivo de validar se a sobre-expressão do gene *c-fos* estaria realmente a influenciar a sobre-expressão da ciclina D1, colocámos a hipótese de que se tal fosse verdade, ao diminuir a expressão do gene *c-fos* a expressão da ciclina D1 também estaria diminuída. Uma das formas de manipular a expressão de determinados genes *in vitro* é por RNAi, um processo que leva ao silenciamento pós-transcricional de genes em animais e plantas, e que é iniciado por RNAs de dupla cadeia homólogos à sequência do gene que se pretende silenciar. Através de experiências relativamente simples, conseguimos mimetizar situações de subexpressão de determinados genes, que por sua vez nos permite tirar conclusões sobre a função de determinado gene ou família génica e das diferentes relações entre diferentes genes.

Neste trabalho optimizámos uma metodologia de forma a reduzir os níveis de expressão do transcrito do gene *c-fos* com recurso a siRNAs comerciais específicos para este gene. Estes oligos ligam-se por complementaridade de bases ao mRNA e levam à sua degradação. Verificámos que foi possível diminuir com sucesso a expressão do gene *c-fos*. Em contraste, com recurso aos mesmos oligos, o mesmo não foi possível relativamente à expressão do gene da ciclina D1, regulada por *c-fos*, uma vez que não foram observadas quaisquer alterações na expressão do seu mRNA, após a transfecção com estes siRNAs. A explicação mais simples para este facto é a existência de outros mecanismos celulares que regulem a transcrição da ciclina D1, independentes de *c-fos* e de AP-1 (por exemplo as vias dependentes de Ras, Diehl, 2002). Adicionalmente é importante referir novamente que observámos o aumento dos níveis da expressão do mRNA da ciclina D1 aquando da expressão de todos os componentes do HDV, pelo que

não será de descartar a hipótese de ser o próprio vírus directamente a aumentar essa expressão, independentemente da acção de c-fos. A possibilidade do HDV influenciar a expressão da ciclina D1 por outro mecanismo ainda desconhecido explicaria a ausência de alterações na expressão da ciclina D1 aquando da utilização dos oligos siRNAs específicos para o gene c-fos. Será necessária uma análise mais detalhada da expressão da ciclina D1 assim como dos diferentes mecanismos que a regulam para tentar compreender a sua sobre-expressão no contexto da infecção por HDV.

Um dos aspectos onde a sobre-expressão de c-fos na presença do vírus da hepatite delta poderá ter repercussões é em termos do desenvolvimento de novos fármacos para tratamento das infecções por este vírus. Por exemplo encontra-se actualmente já descrito um fármaco (T-5224) que inibe a função de c-fos, tendo sido utilizado como anti-inflamatório em lesões renais agudas, degeneração dos discos intervertebrais, metástases dos nódulos linfáticos e artrite (Tsuchida *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 2012; Makino *et al.*, 2017; Kamide *et al.*, 2016; Aikawa *et al.*, 2008). Também em doenças hepáticas foram já feitos alguns progressos na capacidade anti-inflamatória do T-5224, nomeadamente impedindo a produção de TNF α e aumentando a produção de interleucina 10. Esta interleucina é uma importante citocina anti-inflamatória, uma vez que diminui a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (Izuta *et al.*, 2012; de Waal *et al.*, 1991). Será por isso interessante testar no futuro o potencial deste fármaco nas infecções por HDV.

Uma outra alternativa para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento da infecção por HDV, com base na sobre-expressão do gene c-fos observada, seria a utilização de oligos *antisense*. Oligos *antisense* são pequenos fragmentos de DNA complementares ao mRNA pretendido, onde após a ligação existe clivagem da molécula de mRNA pela enzima RNase H, deixando de ser possível a tradução daquele transcrito (Castanotto & Stein, 2014). Este tipo de terapia genética já obteve resultados em outras patologias, como são os casos de hipercolesteremia familiar, de hipertensão arterial, de distrofia muscular e de fibrose túbulo-intersticial renal (Toth, 2013; Phillips *et al.*, 2015; El-Basyuni *et al.*, 2016; Ferland *et al.*, 2018; Lu-Nguyen *et al.*, 2015; Yokoi *et al.*, 2004). Apesar de ser uma área muito desafiante e ainda em estadios exploratórios, existem já

algumas perspectivas do seu uso em cânceros de diferentes etiologias (Izumi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Xu & Xu, 2018).

Para terminar, durante a realização deste trabalho foram identificadas mais algumas questões que gostaríamos de responder num trabalho futuro. Primeiramente, todos os demais genes identificados pela técnica de RNA-seq poderão ser analisados com o mesmo detalhe que foi o gene *c-fos*, de forma a perceber que implicações têm para a infecção por HDV e para o desenvolvimento de HCC. A título de exemplo o gene *FGFR2*, pertencente à família dos receptores dos factores de crescimento dos fibroblastos é descrito como um importante gene na proliferação e diferenciação celular, na motilidade e na angiogénese. Concretamente em carcinoma hepatocelular, a sobre-expressão do gene *FGFR2* encontra-se associada a uma menor taxa de sobrevivência dos doentes e a um tumor num menor estadio de diferenciação histológica, encontrando-se ainda o gene *FGFR2* associado ao desenvolvimento de outros cânceros (Grose & Dickson, 2005; Katoh & Katoh, 2009; Harimoto *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015). Também um estudo recente associa a expressão deste receptor com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular devido à infecção por HBV ou por HCV (Lin *et al.*, 2013), pelo que é possível que num futuro próximo o laboratório caminhe para o estudo do papel deste gene e de outros identificados para o desenvolvimento de HCC associado ao vírus da hepatite delta.

Adicionalmente, mesmo para o gene *c-fos* existem outros temas que poderão ser explorados futuramente. Estudos anteriores efectuados neste laboratório identificaram que o HDV interage com factores de *splicing* do hospedeiro, promovendo alterações no *splicing* e na expressão de genes endógenos associados a ciclo celular. Tal faz-nos pensar na hipótese de que as alterações de expressão por nós observadas no gene *c-fos* aquando da infecção por HDV podem ser devidas a alterações nos padrões de *splicing* associados a este gene. Curiosamente este pensamento também pode ser aplicado à ciclina D1, uma vez que para este gene já se encontra bem descrito um evento de *splicing* alternativo. Este evento dá origem a uma outra forma designada ciclina D1b onde o quarto intrão não é removido, resultando numa região C-terminal diferente e na perda de um motivo importante para degradação da ciclina D1, levando por isso à sua acumulação. É interessante realçar que esta forma ocorre principalmente em contexto de cancro (Lu *et*

al., 2003; Knudsen *et al.*, 2006). Será por isso interessante explorar em que medida as alterações de expressão destes dois genes na presença de HDV, estarão relacionadas com alterações do seu padrão de *splicing*, e qual a sua importância para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Por último, num futuro próximo pretendemos confirmar os resultados aqui apresentados recorrendo à utilização de amostras biológicas, como por exemplo biópsias ou amostras de sangue periférico derivadas de doentes infectados com HDV e inclusive de doentes apenas infectados com HBV, permitindo analisar se os resultados aqui apresentados reproduzem o que ocorre num contexto de infecção real por HDV.

Concluimos assim que este trabalho, para além de nos ter fornecido uma perspectiva genómica das alterações induzidas pelo HDV, permitiu-nos a identificação do gene *c-fos* como um dos genes envolvidos no processo de infecção por HDV, assim como possíveis consequências para a normal progressão do ciclo celular (através da regulação da expressão da ciclina D1 pelo gene *c-fos*) que por sua vez pode levar ao desenvolvimento do processo oncogénico.

5. Referências Bibliográficas

- Abbas, Z., Abbas, M., Abbas, S. and Shazi, L. (2015) 'Hepatitis D and hepatocellular carcinoma', *World journal of hepatology*, 7(5), 777-786.
- Aikawa, Y., Morimoto, K., Yamamoto, T., Chaki, H., Hashiramoto, A., Narita, H., Hirono, S. and Shiozawa, S. (2008) 'Treatment of arthritis with a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1', *Nature biotechnology*, 26(7), 817-823.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. and Pestell, R. G. (1995) 'Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions', *Journal of Biological Chemistry*, 270(40), 23589-23597.
- Alt, J. R., Cleveland, J. L., Hannink, M. and Diehl, J. A. (2000) 'Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation', *Genes & development*, 14(24), 3102-3114.
- Alves, C., Branco, C. and Cunha, C. (2013) 'Hepatitis delta virus: a peculiar virus', *Advances in virology*, 2013.
- Andrews, S. (2010) 'FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data', [www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc], acessado a 18-05-2018.
- Anwer, M. S. and Stieger, B. (2014) 'Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters', *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466(1), 77-89.
- Arbuthnot, P., Kew, M. and Fitschen, W. (1991) 'c-fos and c-myc oncoprotein expression in human hepatocellular carcinomas', *Anticancer research*, 11(2), 921-924.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S. and Eppig, J. T. (2000) 'Gene Ontology: tool for the unification of biology', *Nature genetics*, 25(1), 25-29.
- Ashida, R., Tominaga, K., Sasaki, E., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Mitsuyama, S., Iwao, H. and Arakawa, T. (2005) 'AP-1 and colorectal cancer', *Inflammopharmacology*, 13(1-3), 113-125.
- Bakin, A. and Curran, T. (1999) 'Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos', *Science*, 283(5400), 387-390.
- Bamberger, A.-M., Milde-Langosch, K., Rössing, E., Goemann, C. and Löning, T. (2001) 'Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators', *Journal of cancer research and clinical oncology*, 127(9), 545-550.
- Benegiamo, G., Vinciguerra, M., Guarnieri, V., Niro, G. A., Andriulli, A. and Pazienza, V. (2013) 'Hepatitis delta virus induces specific DNA methylation processes in Huh-7 liver cancer cells', *FEBS letters*, 587(9), 1424-1428.

- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) 'Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing', *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Benn, J., Su, F., Doria, M. and Schneider, R. J. (1996) 'Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases', *Journal of virology*, 70(8), 4978-4985.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001) 'Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference', *Nature*, 409(6818), 363-366.
- Bertani, G. (1951) 'Studies on Lysogenesis I: The Mode of Phage Liberation by lysogenic *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Blank, A., Markert, C., Hohmann, N., Carls, A., Mikus, G., Lehr, T., Alexandrov, A., Haag, M., Schwab, M. and Urban, S. (2016) 'First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B', *Journal of hepatology*, 65(3), 483-489.
- Bogomolov, P., Alexandrov, A., Voronkova, N., Macievich, M., Kokina, K., Petrachenkova, M., Lehr, T., Lempp, F. A., Wedemeyer, H. and Haag, M. (2016) 'Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study', *Journal of hepatology*, 65(3), 490-498.
- Botelho-Souza, L. F., Vasconcelos, M. P. A., dos Santos, A. d. O., Salcedo, J. M. V. and Vieira, D. S. (2017) 'Hepatitis delta: virological and clinical aspects', *Virology journal*, 14(1), 177-191.
- Botelho-Souza, L. F., Vieira, D. S., dos Santos, A. d. O., Pereira, A. V. C. and Villalobos-Salcedo, J. M. (2015) 'Characterization of the genotypic profile of hepatitis delta virus: isolation of HDV genotype-1 in the Western Amazon Region of Brazil', *Intervirology*, 58(3), 166-171.
- Cairns, R. A., Harris, I. S. and Mak, T. W. (2011) 'Regulation of cancer cell metabolism', *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85-95.
- Careda, F., d'Arminio, A. M., Rossi, E., Farci, P., Smedile, A., Tappero, G. and Moroni, M. (1983) 'Prospective study of epidemic delta infection in drug addicts', *Progress in clinical and biological research*, 143, 245-250.
- Casey, J. L., Niro, G. A., Engle, R. E., Vega, A., Gomez, H., McCarthy, M., Watts, D. M., Hyams, K. C. and Gerin, J. L. (1996) 'Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F', *Journal of Infectious Diseases*, 174(5), 920-926.

- Castanotto, D. and Stein, C. A. (2014) 'Antisense oligonucleotides in cancer', *Current opinion in oncology*, 26(6), 584-589.
- Chang, J., Nie, X., Chang, H. E., Han, Z. and Taylor, J. (2008) 'Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II', *Journal of virology*, 82(3), 1118-1127.
- Chao, M., Hsieh, S.-Y. and Taylor, J. (1990) 'Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication', *Journal of virology*, 64(10), 5066-5069.
- Chen, P.-J., Kalpana, G., Goldberg, J., Mason, W., Werner, B., Gerin, J. and Taylor, J. (1986) 'Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8774-8778.
- Chou, H.-C., Hsieh, T.-Y., Sheu, G.-T. and Lai, M. M. (1998) 'Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA', *Journal of virology*, 72(5), 3684-3690.
- Christov, C., Trivier, E. and Krude, T. (2008) 'Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation', *British journal of cancer*, 98(5), 981-988.
- Dawson, P. A., Lan, T. and Rao, A. (2009) 'Bile acid transporters', *Journal of lipid research*, 50(12), 2340-2357.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. and De Vries, J. E. (1991) 'Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes', *Journal of Experimental Medicine*, 174(5), 1209-1220.
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. and Thompson, C. B. (2008) 'The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation', *Cell metabolism*, 7(1), 11-20.
- Dény, P. (2006) 'Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades?', *Current topics in microbiology and immunology*, 307, 151-171.
- DGS (Direção Geral da Saúde) (2017) 'Programa Nacional para as Hepatites Virais'.
- Diehl, J. A. (2002) 'Cycling to cancer with cyclin D1', *Cancer biology & therapy*, 1(3), 226-231.
- Ding, Z. Y., Liang, H. F., Jin, G. N., Chen, W. X., Wang, W., Datta, P. K., Zhang, M. Z., Zhang, B. and Chen, X. P. (2014) 'Smad6 suppresses the growth and self-renewal of hepatic progenitor cells', *Journal of cellular physiology*, 229(5), 651-660.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. and Gingeras, T. R. (2013) 'STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner', *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. and Yakhini, Z. (2009) 'GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists', *BMC bioinformatics*, 10, 48-54.

- Eferl, R. and Wagner, E. F. (2003) 'AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis', *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 859-868.
- Efron, B., Tibshirani, R., Storey, J. D. and Tusher, V. (2001) 'Empirical Bayes analysis of a microarray experiment', *Journal of the American statistical association*, 96(456), 1151-1160.
- Elazar, M., Koh, C. and Glenn, J. S. (2017) 'Hepatitis delta infection—Current and new treatment options', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(3), 321-327.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) 'Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells', *Nature*, 411(6836), 494-498.
- El-Basyuni, Y. A., Li, Y. and Anand-Srivastava, M. B. (2016) 'Knockdown of Inhibitory Guanine Nucleotide Binding Protein $G_{i\alpha-2}$ by Antisense Oligodeoxynucleotides Attenuates the Development of Hypertension and Tachycardia in Spontaneously Hypertensive Rats', *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 5(11), e004594.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. and Källér, M. (2016) 'MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report', *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.
- Eychène, A., Rocques, N. and Pouponnot, C. (2008) 'A new MAFia in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 683-693.
- Fang, Z., Martin, J. and Wang, Z. (2012) 'Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments', *Cell & Bioscience*, 2, 26-33.
- Farci, P., Mandas, A., Coiana, A., Lai, M. E., Desmet, V., Van Eyken, P., Gibo, Y., Caruso, L., Scaccabarozzi, S. and Criscuolo, D. (1994) 'Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a', *New England Journal of Medicine*, 330(2), 88-94.
- Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zagni, I., Realdi, G., Schalm, S. and Hepatitis, E. C. A. o. V. (2000) 'Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B', *Gut*, 46(3), 420-426.
- Ferland, D. J., Seitz, B., Darios, E. S., Thompson, J. M., Yeh, S. T., Mullick, A. E. and Watts, S. W. (2018) 'Whole-Body but Not Hepatic Knockdown of Chemerin by Antisense Oligonucleotide Decreases Blood Pressure in Rats', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(2), 212-218.
- Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M. and Beug, H. (1996) 'The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell

- polarity involving a destabilization of adherens junctions', *The Journal of cell biology*, 132(6), 1115-1132.
- Freitas, N., Salisse, J., Cunha, C., Toshkov, I., Menne, S. and Gudima, S. O. (2012) 'Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks', *Hepatology*, 56(1), 76-85.
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T. and Pestell, R. G. (2004) 'Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions', *Endocrinology*, 145(12), 5439-5447.
- Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Chen, W., Li, Y. and Zeng, R. (2009) 'Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics', *BMC genomics*, 10, 161-169.
- Grose, R. and Dickson, C. (2005) 'Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis', *Cytokine & growth factor reviews*, 16(2), 179-186.
- Gudima, S., Chang, J., Moraleda, G., Azvolinsky, A. and Taylor, J. (2002) 'Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA', *Journal of virology*, 76(8), 3709-3719.
- Gudima, S., Dingle, K., Wu, T.-T., Moraleda, G. and Taylor, J. (1999) 'Characterization of the 5' ends for polyadenylated RNAs synthesized during the replication of hepatitis delta virus', *Journal of virology*, 73(8), 6533-6539.
- Güller, M., Toualbi-Abed, K., Legrand, A., Michel, L., Mauviel, A., Bernuau, D. and Daniel, F. (2008) 'c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear Cyclin D1', *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(41), 6339-6346.
- Gunsar, F. (2013) 'Treatment of delta hepatitis', *Expert review of anti-infective therapy*, 11(5), 489-498.
- Gunsar, F., Akarca, U. S., Ersoz, G., Kobak, A. C., Karasu, Z., Yuce, G., Ilter, T. and Batur, Y. (2005) 'Two-year interferon therapy with or without ribavirin in chronic delta hepatitis', *Antiviral therapy*, 10(6), 721-726.
- GursesCila, H. E., Acar, M., Barut, F. B., Gunduz, M., Grenman, R. and Gunduz, E. (2016) 'Investigation of the expression of RIF1 gene on head and neck, pancreatic and brain cancer and cancer stem cells', *Clinical & Investigative Medicine*, 39(6), 43-47.
- Gustems, M., Woellmer, A., Rothbauer, U., Eck, S. H., Wieland, T., Lutter, D. and Hammerschmidt, W. (2013) 'c-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs', *Nucleic acids research*, 42(5), 3059-3072.

- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lübbert, H. and Meier, P. J. (1991) 'Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10629-10633.
- Halazonetis, T., Georgopoulos, K., Greenberg, M. and Leder, P. (1988) 'c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities', *Cell*, 55(5), 917-924.
- Harimoto, N., Taguchi, K., Shirabe, K., Adachi, E., Sakaguchi, Y., Toh, Y., Okamura, T., Kayashima, H., Taketomi, A. and Maehara, Y. (2010) 'The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma', *Oncology*, 78(5-6), 361-368.
- Heermann, K. and Gerlich, W. (1991) 'Surface proteins of hepatitis B viruses' in *Molecular biology of the hepatitis B virus*, CRC Press, 109-143.
- Heermann, K., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. and Gerlich, W. (1984) 'Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence', *Journal of virology*, 52(2), 396-402.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M. and Müller, R. (1994) 'Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter', *Oncogene*, 9(4), 1295-1304.
- Hess, J., Angel, P. and Schorpp-Kistner, M. (2004) 'AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings', *Journal of cell science*, 117, 5965-5973.
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.-L. and Karlsson, J. (2007) 'Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines', *Drug Metabolism and Disposition*, 35(8), 1333-1340.
- Hirata, H., Hinoda, Y., Shahryari, V., Deng, G., Nakajima, K., Tabatabai, Z. L., Ishii, N. and Dahiya, R. (2015) 'Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205', *Cancer research*, 75(7).
- Hong, S.-Y. and Chen, P.-J. (2010) 'Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II', *Journal of virology*, 84(3), 1430-1438.
- Hsieh, H.-L., Wang, H.-H., Wu, C.-Y. and Yang, C.-M. (2010) 'Reactive oxygen species-dependent c-Fos/activator protein 1 induction upregulates heme oxygenase-1 expression by bradykinin in brain astrocytes', *Antioxidants & redox signaling*, 13(12), 1829-1844.
- Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, V., Johnson, R. and Spiegelman, B. (1994) 'Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and-independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes', *The EMBO journal*, 13(13), 3094-3103.

- Huang, C.-R. and Lo, S. J. (2014) 'Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus', *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14589-14597.
- Hughes, S. A., Wedemeyer, H. and Harrison, P. M. (2011) 'Hepatitis delta virus', *The Lancet*, 378(9785), 73-85.
- Izumi, H., Nagao, S., Mochizuki, S., Fujiwara, N., Sakurai, K. and Morimoto, Y. (2016) 'Optimal sequence of antisense DNA to silence YB-1 in lung cancer by use of a novel polysaccharide drug delivery system', *International journal of oncology*, 48(6), 2472-2478.
- Izuta, S., Ueki, M., Ueno, M., Nishina, K., Shiozawa, S. and Maekawa, N. (2012) 'T-5224, a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1, attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in mice', *Biotechnology letters*, 34(12), 2175-2182.
- Jayan, G. C. and Casey, J. L. (2002) 'Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression', *Journal of virology*, 76(23), 12399-12404.
- Jin, S. P., Kim, J. H., Kim, M. A., Yang, H.-K., Lee, H. E., Lee, H. S. and Kim, W. H. (2007) 'Prognostic significance of loss of c-fos protein in gastric carcinoma', *Pathology & Oncology Research*, 13(4), 284-289.
- Joo, M., Kang, Y. K., Kim, M. R., Lee, H. K. and Jang, J. J. (2001) 'Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma', *Liver*, 21(2), 89-95.
- Kamide, D., Yamashita, T., Araki, K., Tomifuji, M., Tanaka, Y., Tanaka, S., Shiozawa, S. and Shiotani, A. (2016) 'Selective activator protein-1 inhibitor T-5224 prevents lymph node metastasis in an oral cancer model', *Cancer science*, 107(5), 666-673.
- Kang, S.-M., Lim, S., Won, S.-J., Shin, Y.-J., Lim, Y.-S., Ahn, B.-Y. and Hwang, S. B. (2011) 'c-Fos regulates hepatitis C virus propagation', *FEBS letters*, 585(20), 3236-3244.
- Kato, J.-y. and Sherr, C. J. (1993) 'Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11513-11517.
- Kato, Y. and Kato, M. (2009) 'FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics', *International journal of molecular medicine*, 23(3), 307-311.
- Khatri, P. and Drăghici, S. (2005) 'Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems', *Bioinformatics*, 21(18), 3587-3595.
- Kiesslich, D., Crispim, M. A., Santos, C., de Lima Ferreira, F., Fraiji, N. A., Komninakis, S. V. and Diaz, R. S. (2009) 'Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus', *The Journal of infectious diseases*, 199, 1608-1611.

- Klein, E. A. and Assoian, R. K. (2008) 'Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance', *Journal of cell science*, 121(23), 3853-3857.
- Knudsen, K., Diehl, J. A., Haiman, C. and Knudsen, E. (2006) 'Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk', *Oncogene*, 25(11), 1620-1628.
- Kogenaru, S., Yan, Q., Guo, Y. and Wang, N. (2012) 'RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling', *BMC genomics*, 13, 629-644.
- Koh, C., Canini, L., Dahari, H., Zhao, X., Uprichard, S. L., Haynes-Williams, V., Winters, M. A., Subramanya, G., Cooper, S. L. and Pinto, P. (2015) 'Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial', *The Lancet Infectious Diseases*, 15(10), 1167-1174.
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007) 'Enhancements and modifications of primer design program Primer3', *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291.
- Kos, A., Dubbeld, M., Murray, K., Bruce, S., Beattie, P., Arnberg, A. and Schellekens, H. (1987) 'Biological and molecular characterization of the hepatitis delta virus', *Progress in clinical and biological research*, 234, 83-87.
- Koukouritaki, S. B., Simpson, P., Yeung, C. K., Rettie, A. E. and Hines, R. N. (2002) 'Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression', *Pediatric research*, 51(2), 236-243.
- Kukurba, K. R. and Montgomery, S. B. (2015) 'RNA sequencing and analysis', *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(11), 951-969.
- Kuo, M.-P., Chao, M. and Taylor, J. (1989) 'Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen', *Journal of virology*, 63(5), 1945-1950.
- Le Gal, F., Gault, E., Ripault, M.-P., Serpaggi, J., Trinchet, J.-C., Gordien, E. and Dény, P. (2006) 'Eighth major clade for hepatitis delta virus', *Emerging infectious diseases*, 12(9), 1447-1450.
- Lee, C.-H., Chang, S. C., Wu, C. H. and Chang, M.-F. (2001) 'A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly', *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8142-8148.
- Lee, C.-Z., Chen, P.-J., Lai, M. M. and Chen, D.-S. (1994) 'Isoprenylation of Large Hepatitis Delta Antigen Is Necessary but Not Sufficient for Hepatitis Delta Virus Assembly', *Virology*, 199(1), 169-175.
- Lee, H. J., Kang, H. J., Kim, K. M., Yu, E. S., Kim, K. H., Kim, S.-M., Kim, T. W., Shim, J. H., Lim, Y.-S. and Lee, H. C. (2015) 'Fibroblast growth factor receptor isotype expression

- and its association with overall survival in patients with hepatocellular carcinoma', *Clinical and molecular hepatology*, 21(1), 60-70.
- Levin, W. J., Press, M. F., Gaynor, R. B., Sukhatme, V. P., Boone, T. C., Reissmann, P. T., Figlin, R. A., Holmes, E. C., Souza, L. M. and Slamon, D. J. (1995) 'Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group', *Oncogene*, 11(7), 1261-1269.
- Li, J., Witten, D. M., Johnstone, I. M. and Tibshirani, R. (2012) 'Normalization, testing, and false discovery rate estimation for RNA-sequencing data', *Biostatistics*, 13(3), 523-538.
- Li, Y., Chen, Y., Li, J., Zhang, Z., Huang, C., Lian, G., Yang, K., Chen, S., Lin, Y. and Wang, L. (2017) 'Co-delivery of micro RNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy', *Cancer science*, 108(7), 1493-1503.
- Li, Y.-J., Stallcup, M. R. and Lai, M. M. (2004) 'Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication', *Journal of virology*, 78(23), 13325-13334.
- Liao, F.-T., Lee, Y.-J., Ko, J.-L., Tsai, C.-C., Tseng, C.-J. and Sheu, G.-T. (2009) 'Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells', *Journal of General Virology*, 90(5), 1124-1134.
- Lin, K.-T., Shann, Y.-J., Chau, G.-Y., Hsu, C.-N. and Huang, C. F. (2014) 'Identification of latent biomarkers in hepatocellular carcinoma by ultra-deep whole-transcriptome sequencing', *Oncogene*, 33(39), 4786-4794.
- Liu, G., Takano, T., Matsuzuka, F., Higashiyama, T., Kuma, K. and Amino, N. (1999) 'Screening of Specific Changes in mRNAs in Thyroid Tumors by Sequence Specific Differential Display', *Endocrine journal*, 46(3), 459-466.
- Liu, P., Kimmoun, E., Legrand, A., Sauvanet, A., Degott, C., Lardeux, B. and Bernuau, D. (2002) 'Activation of NF-kappaB, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas', *Journal of hepatology*, 37(1), 63-71.
- Longarela, O. L., Schmidt, T. T., Schöneweis, K., Romeo, R., Wedemeyer, H., Urban, S. and Schulze, A. (2013) 'Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors', *PLoS One*, 8(3), e58340.
- Lu, F., Gladden, A. B. and Diehl, J. A. (2003) 'An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene', *Cancer research*, 63(21), 7056-7061.
- Luo, G., Chao, M., Hsieh, S., Sureau, C., Nishikura, K. and Taylor, J. (1990) 'A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA', *Journal of virology*, 64(3), 1021-1027.

- Macnaughton, T. B., Shi, S. T., Modahl, L. E. and Lai, M. M. (2002) 'Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases', *Journal of virology*, 76(8), 3920-3927.
- Mahner, S., Baasch, C., Schwarz, J., Hein, S., Wölber, L., Jänicke, F. and Milde-Langosch, K. (2008) 'C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma', *British journal of cancer*, 99(8), 1269-1275.
- Makino, H., Seki, S., Yahara, Y., Shiozawa, S., Aikawa, Y., Motomura, H., Nogami, M., Watanabe, K., Sainoh, T. and Ito, H. (2017) 'A selective inhibition of c-Fos/activator protein-1 as a potential therapeutic target for intervertebral disc degeneration and associated pain', *Scientific reports*, 7, 16983-16996.
- Martin, J. A. and Wang, Z. (2011) 'Next-generation transcriptome assembly', *Nature reviews genetics*, 12(10), 671-682.
- Mattu, S., Fornari, F., Quagliata, L., Perra, A., Angioni, M. M., Petrelli, A., Menegon, S., Morandi, A., Chiarugi, P. and Ledda-Columbano, G. M. (2016) 'The metabolic gene HAO2 is downregulated in hepatocellular carcinoma and predicts metastasis and poor survival', *Journal of hepatology*, 64(4), 891-898.
- McCarthy, D. J., Chen, Y. and Smyth, G. K. (2012) 'Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation', *Nucleic acids research*, 40(10), 4288-4297.
- Mikula, M., Gotzmann, J., Fischer, A. N., Wolschek, M. F., Thallinger, C., Schulte-Hermann, R., Beug, H. and Mikulits, W. (2003) 'The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis', *Oncogene*, 22(43), 6725-6738.
- Milde-Langosch, K. (2005) 'The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis', *European journal of cancer*, 41(16), 2449-2461.
- Milde-Langosch, K., Röder, H., Andritzky, B., Aslan, B., Hemminger, G., Brinkmann, A., Bamberger, C. M., Löning, T. and Bamberger, A.-M. (2004) 'The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas', *Breast cancer research and treatment*, 86(2), 139-152.
- Miyake, H., Hara, I., Fujisawa, M. and Gleave, M. E. (2006) 'The potential of clusterin inhibiting antisense oligodeoxynucleotide therapy for prostate cancer', *Expert opinion on investigational drugs*, 15(5), 507-517.
- Miyazaki, H., Morishita, J., Ueki, M., Nishina, K., Shiozawa, S. and Maekawa, N. (2012) 'The effects of a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 on endotoxin-induced acute kidney injury in mice', *BMC nephrology*, 13, 153-159.

- Moore, G. E., Gerner, R. E. and Franklin, H. A. (1967) 'Culture of normal human leukocytes', *Jama*, 199(8), 519-524.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. (2008) 'Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq', *Nature methods*, 5(7), 621-628.
- Mu, J.-J., Tsay, Y.-G., Juan, L.-J., Fu, T.-F., Huang, W.-H., Chen, D.-S. and Chen, P.-J. (2004) 'The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis', *Virology*, 319(1), 60-70.
- Muhammad, N., Bhattacharya, S., Steele, R., Phillips, N. and Ray, R. B. (2017) 'C-Fos drives non-tumorigenic head and neck squamous cell carcinoma cells to tumorigenic by promoting cancer stem cells like properties', *Cancer research*, 77(13), 5761.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J. (1982) 'Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium', *Cancer research*, 42(9), 3858-3863.
- Niro, G., Rosina, F. and Rizzetto, M. (2005) 'Treatment of hepatitis D', *Journal of viral hepatitis*, 12(1), 2-9.
- Nordenstedt, H., White, D. L. and El-Serag, H. B. (2010) 'The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma', *Digestive and Liver Disease*, 42, S206-S214.
- Otto, J. C. and Casey, P. J. (1996) 'The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells', *Journal of Biological Chemistry*, 271(9), 4569-4572.
- Ozsolak, F. and Milos, P. M. (2011) 'RNA sequencing: advances, challenges and opportunities', *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
- Paraná, R., Kay, A., Molinet, F., Viana, S., Silva, L. K., Salcedo, J. M., Tavares-Neto, J., Lobato, C., Rios-Leite, M. and Matteoni, L. (2006) 'HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: a preliminary report', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(3), 475-479.
- Ian Phillips, M., Costales, J., J Lee, R., Oliveira, E. and B Burns, A. (2015) 'Antisense therapy for cardiovascular diseases', *Current pharmaceutical design*, 21(30), 4417-4426.
- Pugnale, P., Paziienza, V., Guilloux, K. and Negro, F. (2009) 'Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling', *Hepatology*, 49(2), 398-406.
- Qie, S. and Diehl, J. A. (2016) 'Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment', *Journal of Molecular Medicine*, 94(12), 1313-1326.
- R Core Team. (2018) 'R: A language and environment for statistical computing.' R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [<https://www.R-project.org/>]

- Rajkumar, A. P., Qvist, P., Lazarus, R., Lescai, F., Ju, J., Nyegaard, M., Mors, O., Børglum, A. D., Li, Q. and Christensen, J. H. (2015) 'Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq', *BMC genomics*, 16, 548-555.
- Raz, T., Kapranov, P., Lipson, D., Letovsky, S., Milos, P. M. and Thompson, J. F. (2011) 'Protocol dependence of sequencing-based gene expression measurements', *PLoS One*, 6(5), e19287.
- Rizzetto, M. (2016) 'The adventure of delta', *Liver International*, 36(S1), 135-140.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. and Verme, G. (1977) 'Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers', *Gut*, 18(12), 997-1003.
- Rizzetto, M. and Ciancio, A. (2012) *Epidemiology of hepatitis D*, translated by Thieme Medical Publishers, 211-219.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K. (2010) 'edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data', *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Romeo, R., Del Ninno, E., Rumi, M., Russo, A., Sangiovanni, A., De Franchis, R., Ronchi, G. and Colombo, M. (2009) 'A 28-year study of the course of hepatitis Δ infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma', *Gastroenterology*, 136(5), 1629-1638.
- Romeo, R., Foglieni, B., Casazza, G., Spreafico, M., Colombo, M. and Prati, D. (2014) 'High serum levels of HDV RNA are predictors of cirrhosis and liver cancer in patients with chronic hepatitis delta', *PLoS One*, 9(3), e92062.
- Ryseck, R. and Bravo, R. (1991) 'c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins', *Oncogene*, 6(4), 533-542.
- Ryu, W.-S., Bayer, M. and Taylor, J. (1992) 'Assembly of hepatitis delta virus particles', *Journal of virology*, 66(4), 2310-2315.
- Shaulian, E. (2010) 'AP-1—the Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise?', *Cellular signalling*, 22(6), 894-899.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) 'AP-1 as a regulator of cell life and death', *Nature cell biology*, 4(5), E131-E136.
- Shen, Q., Uray, I., Li, Y., Krisko, T., Strecker, T., Kim, H. and Brown, P. (2008) 'The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors', *Oncogene*, 27(3), 366-377.

- Shirvani-Dastgerdi, E., Schwartz, R. E. and Ploss, A. (2016) 'Hepatocarcinogenesis associated with hepatitis B, delta and C viruses', *Current opinion in virology*, 20, 1-10.
- SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) 'ViralZone', [www.expasy.org/viralzone], acessado a 19-04-2018.
- Simpson, L. H., Battegay, M., Hoofnagle, J. H., Waggoner, J. G. and Di Bisceglie, A. M. (1994) 'Hepatitis delta virus RNA in serum of patients with chronic delta hepatitis', *Digestive diseases and sciences*, 39(12), 2650-2655.
- Sleijfer, S., Bannink, M., Van Gool, A. R., Kruit, W. H. and Stoter, G. (2005) 'Side effects of interferon- α therapy', *Pharmacy world and science*, 27(6), 423-431.
- Smedile, A., Verme, G., Cargnel, A., Dentico, P., Opolon, P., Vergani, D., Farci, P., Caredda, F., Caporaso, N. and Trepo, C. (1982) 'Influence of delta infection on severity of hepatitis B', *The Lancet*, 320(8305), 945-947.
- Su, C. W., Huang, Y. H., Huo, T. I., Shih, H. H., Sheen, I. J., Chen, S. W., Lee, P. C., Lee, S. D. and Wu, J. C. (2006) 'Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients', *Gastroenterology*, 130(6), 1625-1635.
- Sureau, C., Guerra, B. and Lanford, R. E. (1993) 'Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion', *Journal of virology*, 67(1), 366-372.
- Sureau, C. and Negro, F. (2016) 'The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis', *Journal of hepatology*, 64(1), S102-S116.
- Szalóki, N., Krieger, J. W., Komáromi, I., Tóth, K. and Vámosi, G. (2015) 'Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by FRET, SPIM-FCCS and MD-modeling', *Molecular and cellular biology*, 35(21), 3785-3798.
- Tashiro, E., Tsuchiya, A. and Imoto, M. (2007) 'Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression', *Cancer science*, 98(5), 629-635.
- Tavanez, J. P., Cunha, C., Silva, M. C., David, E., Monjardino, J. and Carmo-Fonseca, M. (2002) 'Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm', *Rna*, 8(5), 637-646.
- Tavanez, J. P., Madl, T., Kooshapur, H., Sattler, M. and Valcárcel, J. (2012) 'hnRNP A1 proofreads 3' splice site recognition by U2AF', *Molecular cell*, 45(3), 314-329.
- Taylor, J. M. (1992) 'The structure and replication of hepatitis delta virus', *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 253-276.
- Taylor, J. M. (2013) 'Virus entry mediated by hepatitis B virus envelope proteins', *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(40), 6730-6734.
- Taylor, J. M. (2015) 'Hepatitis D virus replication', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(11), a021568.

- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015) 'Global cancer statistics, 2012', *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Toth, P. P. (2013) 'Emerging LDL therapies: Mipomersen—antisense oligonucleotide therapy in the management of hypercholesterolemia', *Journal of clinical lipidology*, 7(3), S6-S10.
- Trierweiler, C., Hockenjos, B., Zatloukal, K., Thimme, R., Blum, H., Wagner, E. and Hasselblatt, P. (2016) 'The transcription factor c-JUN/AP-1 promotes HBV-related liver tumorigenesis in mice', *Cell death and differentiation*, 23(4), 576-582.
- Tseng, C.-H., Cheng, T.-S., Shu, C.-Y., Jeng, K.-S. and Lai, M. M. (2010) 'Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein', *Journal of virology*, 84(2), 918-927.
- Tsuchida, K., Chaki, H., Takakura, T., Kotsubo, H., Tanaka, T., Aikawa, Y., Shiozawa, S. and Hirono, S. (2006) 'Discovery of nonpeptidic small-molecule AP-1 inhibitors: lead hopping based on a three-dimensional pharmacophore model', *Journal of medicinal chemistry*, 49(1), 80-91.
- Tulchinsky, E. (2000) 'Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation', *Histology and histopathology*, 15(3), 921-928.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G. (2012) 'Primer3—new capabilities and interfaces', *Nucleic acids research*, 40(15), e115.
- Van Straaten, F., Müller, R., Curran, T., Van Beveren, C. and Verma, I. M. (1983) 'Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(11), 3183-3187.
- Van Vliet, A. H. (2009) 'Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities', *FEMS microbiology letters*, 302(1), 1-7.
- Verrier, E. R., Colpitts, C. C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., Renaud, M., Durand, S. C., Habersetzer, F., Durantel, D. and Abou-Jaoudé, G. (2016) 'A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses', *Hepatology*, 63(1), 35-48.
- Vigevani, L., Gohr, A., Webb, T., Irimia, M. and Valcárcel, J. (2017) 'Molecular basis of differential 3' splice site sensitivity to anti-tumor drugs targeting U2 snRNP', *Nature communications*, 8(1), 2100.
- Volz, T., Allweiss, L., MBarek, M. B., Warlich, M., Lohse, A. W., Pollok, J. M., Alexandrov, A., Urban, S., Petersen, J. and Lütgehetmann, M. (2013) 'The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus', *Journal of hepatology*, 58(5), 861-867.

- Wang, J., Lian, Y., Gu, Y., Wang, H., Gu, L., Huang, Y., Zhou, L. and Huang, Y. (2017) 'Synergistic effect of farnesyl transferase inhibitor lonafarnib combined with chemotherapeutic agents against the growth of hepatocellular carcinoma cells', *Oncotarget*, 8(62), 105047-105060.
- Wang, K.-S., Choo, Q.-L., Weiner, A. J., Ou, J.-H., Najarian, R. C., Thayer, R. M., Mullenbach, G. T., Denniston, K. J., Gerin, J. L. and Houghton, M. (1986) 'Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (δ) viral genome', *Nature*, 323(6088), 508-514.
- Wang, Q., Liu, H., Wang, Q., Zhou, F., Liu, Y., Zhang, Y., Ding, H., Yuan, M., Li, F. and Chen, Y. (2017) 'Involvement of c-Fos in cell proliferation, migration, and invasion in osteosarcoma cells accompanied by altered expression of Wnt2 and Fzd9', *PLoS One*, 12(6), e0180558.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) 'RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics', *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Wang, Z.-Q., Grigoriadis, A. E., Möhle-Steinlein, U. and Wagner, E. F. (1991) 'A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras', *The EMBO journal*, 10(9), 2437-2450.
- Watanabe, T., Hiasa, Y., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Abe, M., Ikeda, Y., Matsuura, B., Chung, R. T. and Onji, M. (2013) 'Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection', *PLoS One*, 8(7), e67750.
- Watanabe, T., Sorensen, E. M., Naito, A., Schott, M., Kim, S. and Ahlquist, P. (2007) 'Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10205-10210.
- Watashi, K. and Wakita, T. (2015) 'Hepatitis B virus and hepatitis D virus entry, species specificity, and tissue tropism', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a021378.
- Williams, V., Brichler, S., Khan, E., Chami, M., Dény, P., Kremsdorf, D. and Gordien, E. (2012) 'Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress', *Journal of viral hepatitis*, 19(10), 744-753.
- Williams, V., Brichler, S., Radjef, N., Lebon, P., Goffard, A., Hober, D., Fagard, R., Kremsdorf, D., Deny, P. and Gordien, E. (2009) 'Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene', *Journal of General Virology*, 90(11), 2759-2767.

- Wong, C.-M., Tsang, F. H.-C. and Ng, I. O.-L. (2018) 'Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(3), 137-151.
- Wu, H.-N., Lin, Y.-J., Lin, F.-P., Makino, S., Chang, M.-F. and Lai, M. (1989) 'Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(6), 1831-1835.
- Wu, J.-C., Chen, T.-Z., Huang, Y.-S., Yen, F.-S., Ting, L.-T., Sheng, W.-Y., Tsay, S.-H. and Lee, S.-D. (1995) 'Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction', *Gastroenterology*, 108(3), 796-802.
- Wu, J.-C., Chiang, T.-Y. and Sheen, I.-J. (1998) 'Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis', *Journal of General Virology*, 79(5), 1105-1113.
- Xu, M. and Xu, T. (2018) 'Expression and clinical significance of miR-23a and MTSS1 in diffuse large B-cell lymphoma', *Oncology letters*, 16(1), 371-377.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B. and Wang, H. (2012) 'Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus', *elife*, 1, e00049.
- Yokoi, H., Mukoyama, M., Nagae, T., Mori, K., Suganami, T., Sawai, K., Yoshioka, T., Koshikawa, M., Nishida, T. and Takigawa, M. (2004) 'Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis', *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(6), 1430-1440.
- Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y. and Kawahara, Y. (2014) 'Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression', *Molecular cell*, 55(2), 186-198.
- Yuen, M. F., Wu, P. C., Lai, V. C. H., Lau, J. Y. N. and Lai, C. L. (2001) 'Expression of c-Myc, c-Fos, and c-Jun in hepatocellular carcinoma', *Cancer*, 91(1), 106-112.
- Yurdaydın, C., Bozkaya, H., Karaaslan, H., Önder, F., Erkan, Ö., Yalçın, K., Değertekin, H., Bozdayı, A. and Uzunalimoğlu, Ö. (2007) 'A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis', *Journal of viral hepatitis*, 14(11), 812-816.
- Yurdaydın, C., Idilman, R., Bozkaya, H. and Bozdayı, A. (2010) 'Natural history and treatment of chronic delta hepatitis', *Journal of viral hepatitis*, 17(11), 749-756.
- Zerbino, D. R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A. and Girón, C. G. (2017) 'Ensembl 2018', *Nucleic acids research*, 46(D1), D754-D761.

- Zhang, Q., Matsuura, K., Kleiner, D. E., Zamboni, F., Alter, H. J. and Farci, P. (2016) 'Analysis of long noncoding RNA expression in hepatocellular carcinoma of different viral etiology', *Journal of translational medicine*, 14, 328-338.
- Zhao, B., Zhao, W., Wang, Y., Xu, Y., Xu, J., Tang, K., Zhang, S., Yin, Z., Wu, Q. and Wang, X. (2015) 'Connexin32 regulates hepatoma cell metastasis and proliferation via the p53 and Akt pathways', *Oncotarget*, 6(12), 10116-10133.
- Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y. and Yu, J. (2010) 'The next-generation sequencing technology and application', *Protein & cell*, 1(6), 520-536.
- Zhao, Y., Luo, A., Li, S., Zhang, W., Chen, H., Li, Y., Ding, F., Huang, F. and Liu, Z. (2016) 'Inhibitor of Differentiation/DNA Binding 1 (ID1) Inhibits Etoposide-induced Apoptosis in a c-Jun/c-Fos-dependent Manner', *The Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6831-6842.

Anexos

Anexo I

