



**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**
DESDE 1902



**UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA**

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Potencial do inibidor de farnesil-transferase Lonafarnib na
terapêutica da infeção pelo Vírus da Hepatite Delta

Ana Margarida Miragaia Fernandes Pereira

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

(Outubro, 2019)



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Potencial do inibidor de farnesil-transferase Lonafarnib na
terapêutica da infeção pelo Vírus da Hepatite Delta**

Autor: Ana Margarida Miragaia Fernandes Pereira

Orientador: João Paulo Tavanez da Silva Fernandes

Coorientador: 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

A elaboração desta dissertação não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de várias pessoas ao longo do presente ano letivo. Desde já agradeço a todos os que fizeram desta etapa um período de aprendizagem e crescimento a nível pessoal e profissional.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional que desde sempre demonstraram, pelo carinho, coragem e incentivo para atingir os meus objetivos.

Ao Professor João Tavanez, pela disponibilidade, empenho, sabedoria e amizade que sempre demonstrou ao longo da realização deste trabalho. Agradeço ainda pela partilha de conhecimentos e por realçar o meu gosto pela ciência.

Ao Professor Celso Cunha, um enorme obrigado pela oportunidade que me cedeu de realizar este trabalho. Quero também agradecer pela boa disposição e partilha de conhecimentos.

À Inês Brito, a minha colega de laboratório, pela amizade, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou ao longo da minha estadia no laboratório.

Por último, agradeço ainda a todos os que direta ou indiretamente me apoiaram ao longo deste trabalho.

Resumo

O vírus da Hepatite Delta (HDV) é o vírus hepatotrópico responsável pela forma mais severa de hepatite viral. O HDV co-infeta ou super-infeta hepatócitos previamente infectados pelo vírus da hepatite B (HBV), aumentando o risco de hepatite fulminante, desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). A associação existente entre estes dois vírus explica-se pelo facto do invólucro externo do vírus da hepatite delta ser constituído por proteínas de superfície do HBV (HBsAgs). Considera-se assim que o HDV é um vírus satélite do HBV.

O genoma do HDV é constituído por uma única molécula de RNA circular de cadeia simples, codificando uma única proteína, o antigénio delta (HDAg). Através de um mecanismo de *editing* do RNA, obtém-se duas formas do HDAg, a pequena (S-HDAg) e a grande (L-HDAg). Ambas as proteínas virais desempenham diferentes funções no ciclo do HDV, o S-HDAg estimula a replicação do RNA viral, enquanto o L-HDAg é responsável pela inibição da replicação e pela interação com os HBsAgs para formar partículas virais.

Nos dias de hoje, não existe uma terapia específica para tratamento de doentes com infeção HDV e vários estudos têm sido efetuados no sentido de serem desenvolvidas novas terapias que visam eliminar esta infeção. A necessidade de encontrar novas opções terapêuticas levou ao desenvolvimento de fármacos dirigidos a moléculas específicas com relevância para o ciclo do HDV. O L-HDAg sofre um mecanismo de prenilação, importante para a interação com os HBsAgs e que é catalisado por enzimas celulares do grupo das farnesil-transferases. Assim, a utilização de inibidores desta enzima celular poderá constituir uma abordagem terapêutica da infeção provocada por HDV.

Neste trabalho desenvolvemos um estudo em que se avaliou o potencial terapêutico do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib em células Huh7D12, avaliando o impacto em termos de viabilidade celular e correlacionando a capacidade do fármaco intervir nos níveis de expressão do genoma viral do HDV. Avaliamos ainda a ação deste inibidor sobre a expressão do oncogene STAT3, oncogene este que está intimamente associado ao desenvolvimento de CHC.

A análise dos efeitos em termos de viabilidade celular demonstrou que o Lonafarnib apresenta uma citotoxicidade muito inferior aos restantes inibidores de farnesil-transferases previamente estudados no nosso laboratório. Verificou-se que o Lonafarnib interfere no ciclo de vida do HDV, provocando um aumento da expressão do RNA genómico do HDV nas células de hepatocarcinoma humano e influenciando a estabilidade do L-HDAg quando expresso isoladamente. Observou-se ainda, quer por análise de RT-PCR quer por Western Blot, que tratamentos com Lonafarnib conduzem a um aumento da expressão de STAT3 e CCND1.

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o Lonafarnib constitui uma nova abordagem terapêutica com grande potencial no tratamento da infeção por HDV, mas que são necessários estudos moleculares adicionais para analisar a existência de eventuais efeitos secundários negativos, tais como o aumento da expressão do RNA genómico do HDV e do oncogene STAT3.

Palavras-chave: vírus da hepatite delta; prenilação; inibidores de farnesil-transferases; carcinoma hepatocelular; STAT3

Abstract

Hepatitis Delta virus (HDV) is the hepatotropic virus responsible for the most severe form of viral hepatitis. HDV co-infects or super-infects hepatocytes previously infected with the hepatitis B virus (HBV), increasing the risk of fulminant hepatitis, development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The association between these two viruses is explained by the fact that the outer envelope of the hepatitis delta virus is made of HBV surface proteins (HBsAgs). HDV is therefore considered to be an HBV satellite virus.

The HDV genome consists of a single molecule of single stranded circular RNA encoding a single protein, the delta antigen (HDAg). Through a RNA editing mechanism, two forms of the HDAg are obtained, the small (S-HDAg) and the large (L-HDAg). Both viral proteins perform different functions in the HDV infectious cycle, the S-HDAg stimulates viral replication, whereas L-HDAg is responsible for replication inhibition and interaction with HBsAgs to form viral particles.

Currently, there is no specific therapy for the treatment of patients with HDV infection and several studies have been carried out in order to develop new therapies to overcome this limitation. The need to find new therapeutic options has led to the development of drugs aimed at specific molecules with relevance to the HDV infectious cycle. L-HDAg undergoes a prenylation modification, which is important for its interaction with HBsAgs and which is catalysed by cellular enzymes from the farnesyl-transferases group. Thus, the use of inhibitors of these cellular enzymes may constitute a novel therapeutic approach to HDV-induced infection.

In this study, we evaluated the therapeutic potential of the inhibitor of farnesyl-transferases Lonafarnib in Huh7D12 cells, analyzing the impact in terms of cell viability and correlating the drug's ability to intervene in the levels of expression of the HDV viral genome. We also evaluated the effect of this inhibitor on the expression of the STAT3 oncogene, which is intimately associated with the development of HCC.

The analysis of the effects on cell viability showed that Lonafarnib has a much lower cytotoxicity than other farnesyl-transferase inhibitors previously studied in our laboratory. Lonafarnib was found to interfere with the life cycle of HDV, causing an increase in the expression of HDV genomic RNA in human hepatocarcinoma cells and influencing the stability of L-HDAg when expressed isolated. We also show, both by RT-PCR and Western Blot, that treatments with Lonafarnib result in an increase of STAT3 and CCND1 expression.

In conclusion, the results obtained in this study indicate that Lonafarnib may constitute a promising therapeutical approach for the treatment of HDV infection but additional molecular studies are necessary to assess for possible negative side effects, such as the increased expression of the HDV genomic RNA and the STAT3 oncogene.

Keywords: hepatitis delta virus; prenylation; farnesyl-transferase inhibitors; hepatocellular carcinoma; STAT3.

Índice

1. Introdução: Vírus da Hepatite Delta.....	1
1.1. Agente Viral.....	2
1.2. Ciclo de replicação.....	7
1.3. Patologia.....	10
1.4. Transmissão e epidemiologia do HDV.....	12
1.5. Tratamento.....	15
1.6. Objetivo principal.....	18
1.6.1. Objetivos específicos.....	18
2. Materiais e métodos.....	19
2.1. Linhas celulares.....	20
2.1.1. Cultura celular.....	20
2.1.2. Descongelamento das células.....	20
2.1.3. Manutenção da cultura celular.....	21
2.1.4. Cultura de células em placas de seis poços.....	21
2.2. Transformação bacteriana.....	22
2.3. Transfeção transitória de células Huh7.....	22
2.3.1. Extração de RNA total.....	22
2.3.2. Quantificação de RNA e DNA.....	23
2.3.3. Síntese de DNA complementar.....	23
2.3.4. Reação em cadeia de polimerases (PCR).....	24
2.3.5. Eletroforese em gel de agarose.....	25

2.3.6. Preparação de extratos de proteínas e Western Blot.....	25
2.3.7. Fármacos.....	26
3. Resultados.....	27
3.1. Análise dos efeitos do fármaco Lonafarnib em termos de viabilidade celular.....	28
3.2. Efeito do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib na expressão do RNA genómico do HDV.....	32
3.3. Efeito do Lonafarnib na expressão dos antigénios do HDV.....	33
3.4. Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão do oncogene STAT3.....	36
4. Discussão e conclusões.....	39
5. Referências Bibliográficas.....	47

Índice de Figuras

Figura 1.1.: Representação esquemática das três espécies de RNA do HDV.....	4
Figura 1.2.: Representação esquemática da partícula do vírus da hepatite delta.....	5
Figura 1.3.: Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em S-HDAg e L-HDAg.....	6
Figura 1.4.: Prevalência mundial do HDV e distribuição geográfica dos genótipos....	14
Figura 3.1.: Representação da placa de 96 poços, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular.....	29
Figura 3.2.: Representação da placa de 96 poços, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular.....	30
Figura 3.3.: Valores médios dos índices de viabilidade celular das células Huh7D12.....	31
Figura 3.4.: Influência dos compostos A, B e Lonafarnib nos níveis de expressão do RNA genômico do HDV.....	32
Figura 3.5.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão do RNA genômico do HDV.....	33
Figura 3.6.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos antígenos do HDV.....	34
Figura 3.7.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos antígenos do HDV quando expressos de forma isolada.....	35
Figura 3.8.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos fatores STAT3 e CCND1 em células Huh7D12.....	37
Figura 3.9.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos fatores STAT3 e CCND1 em células Huh7.....	38

Índice de Tabelas

Tabela 1.: Primers utilizados nas reações de PCR. Sequência 3'-5' dos primers utilizados para amplificação dos diferentes genes por PCR.....24

Tabela 2.: Etapas realizadas nas reações de PCR, discriminando a temperatura e duração das diferentes etapas.....24

Lista de Abreviaturas

ADAR – deaminase de adenosina de RNA

ALT – alanina-transaminase

CCND1 – *cyclin D1*

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CHC – carcinoma hepatocelular

cm – centímetro

CO₂ – dióxido de carbono

CXXX – C-cisteína, X-qualquer outro aminoácido

dATP – trifosfato de adenina

dCTP – trifosfato de citosina

dGTP – trifosfato de guanina

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – trifosfato de desoxirribonucleótido

dTTP – trifosfato de tirosina

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

et al – *et alia*

FBS – soro bovino fetal

FTI – inibidor de farnesil-transferase

g – grama

h – horas

HBsAg – antígenos de superfície do HBV

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C

HDAg – antígeno delta

HDV – vírus da hepatite D

HSPG – proteoglicano de heparan sulfato

Huh7 – linha celular de carcinoma hepatocelular

IFN-PEG – interferão conjugado com polietilenoglicol

IFN- α – interferão alfa

K(p)b – Kilo (pares) de bases = 10^3 (pares) de bases

kDa – Kilo (Daltons) = 10^3 Daltons

L-HBsAg – forma grande dos antígenos de superfície do HBV

L-HDAg – forma grande do antígeno delta

m – mili, prefixo que designa 10^{-3}

MgCl₂ – cloreto de magnésio

M-HBsAg – forma média dos antígenos de superfície do HBV

MIU – milhões de unidades

ml – mililitro

mM – milimolar

mm – milímetro

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NES – sinal de exportação nuclear

NF- κ B – ativador do fator nuclear kappa B (*factor nuclear kappa*)

NLS – sinal de localização nuclear

nm – nanometro = 10^{-9} metros

NOX – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina - oxidase (NADPH oxidase)

nt – nucleótidos

NTCP – polipeptídeo de cotransporte taurocolato de sódio

°C – graus Celcius

OLIG – sinal de oligomerização

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – grelha de leitura aberta

PBS – solução salina tamponada por fosfatos

PCR – reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

PEG – polietilenoglicol

PML – *promyelocytic leukemia*

pol I – polimerase I

pol II – polimerase II

pol III – polimerase III
poli(A) – cauda poliadenilada
primer – oligonucleótidos iniciadores
qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real (*real time quantitative - PCR*)
RBD – domínio de ligação a RNA
RNA – ácido ribonucleico
RNases – ribonucleases
RNP – ribonucleoproteína
ROS – espécies reativas de oxigénio
RE – retículo endoplasmático
rpm – rotações por minuto
RT – reação de transcrição reversa (*reverse transcription*)
RT-PCR – PCR via transcriptase reversa (*reverse transcription - PCR*)
S-HBsAg – forma pequena dos antígenos de superfície do HBV
S-HDAg – forma pequena do antígeno delta
STAT – *signal transducers and activators of transcription*
STAT3 – *signal transducers and activators of transcription 3*
TAE – Tris-acetato-EDTA
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)
U – unidade
UAG – codão stop (*amber stop codon*)
UGG – codão triptofano (*tryptophan codon*)
UV – ultravioleta
v/v – percentagem volume por volume
 μ – micro, prefixo que designa 10^{-6}
 μg – microgramas
 μl – microlitro
 μM – micromolar

1. Introdução

1. Introdução

Vírus da Hepatite Delta

O vírus da hepatite delta (HDV) foi descoberto por Mário Rizzetto durante a observação de biópsias de fígado de pacientes portadores de doença hepática crónica. Estas biópsias com marcadores de Infecção de vírus da hepatite B (HBV) apresentavam um antígeno nuclear ao qual mais tarde foi atribuída a designação de antígeno delta (HDAg), (Rizzetto *et al.*, 1977). Posteriormente, por meio de infeções experimentais, foi demonstrado que o HDAg em agregação com uma molécula de RNA formava uma porção interna de um vírus distinto do HBV (Rizzetto *et al.*, 1980). Atualmente, o vírus da hepatite delta é o agente etiológico da forma mais grave da hepatite viral em humanos, sendo considerado um dos mais patogénicos e agressivos dos vírus hepatotrópicos (Alves *et al.*, 2013).

O agente infeccioso HDV não possui capacidade para codificar proteínas do seu invólucro recorrendo às proteínas de superfície do HBV (HBsAg) para realizar o empacotamento das partículas infecciosas a fim de completar o seu ciclo biológico. A dependência do HDV da presença de HBV para o estabelecimento de uma infeção transmissível pelo HDV veio a evidenciar a associação clínica existente entre os dois vírus. Ou seja, o HDV é encontrado apenas em indivíduos infetados com HBV sendo considerado um vírus satélite do HBV (Taylor, 2015). Em consequência desta associação e devido às particularidades estruturais do seu genoma, o HDV foi considerado o único representante do género *Deltavirus* (Gerin, 1994; Murphy, 1996; Gerin *et al.*, 2001).

1.1. Agente Viral

Biologicamente, o vírus da hepatite delta assemelha-se a um grupo de agentes patogénicos infecciosos das plantas, viróides. Estas semelhanças dizem respeito à formação de estruturas de RNA semelhante a bastonetes, ao seu reduzido tamanho e ao modo de replicação. Todavia, o HDV possui um genoma maior capaz de codificar o seu próprio antígeno (Flores *et al.*, 2016). O virião do HDV apresenta uma estrutura

esférica, com um diâmetro de cerca de 36nm, revestido externamente pelas proteínas de superfície do HBV e por lípidos celulares (He *et al.*, 1989). As três formas de HBsAgs são traduzidas a partir de uma única grelha aberta de leitura (ORF). Estas proteínas são designadas por pequena (S-HBsAg), média (M-HBsAg) e grande (L-HBsAg), de acordo com o seu tamanho, encontrando-se numa proporção aproximada de 95:5:1 (Sureau, 2006). Enquanto que a proteína S-HBsAg é formada por 226 aminoácidos, constituindo o domínio S, a forma média é ampliada por uma sequência de 55 aminoácidos de um domínio pré-S2. Por sua vez, a proteína L-HBsAg possui um domínio pré-S1 localizado a montante do domínio pré-S2, com 108-119 aminoácidos (Hourieux *et al.*, 1998).

A parte interna do virião corresponde ao genoma do HDV associado num complexo ribonucleoproteico (RNP) com múltiplas cópias de antigénio delta. O genoma do HDV consiste numa molécula de RNA circular de cadeia simples, com aproximadamente 1.7Kb de dimensão e de polaridade negativa (Cunha *et al.*, 1998). A sua estrutura de bastonete não ramificado deve-se ao facto de a molécula de RNA possuir cerca de 70% de complementaridade de bases, contribuindo para a ocorrência de múltiplos emparelhamentos no interior da molécula (Niro e Smedile, 2012).

Para além do RNA genómico, outros tipos de moléculas de RNA viral são produzidos durante o processo de replicação do HDV, concretamente o RNA antigenómico e o RNA mensageiro (figura 1.1).

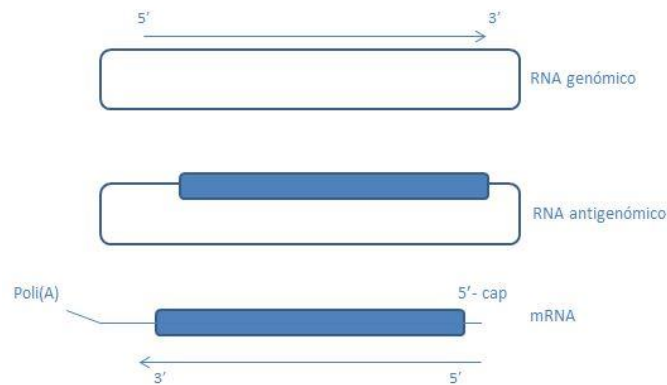


Figura 1.1.: Representação esquemática das três espécies de RNA do HDV.

O RNA genômico do vírus da hepatite delta consiste num RNA circular de cadeia simples constituído por cerca de 1700 nucleótidos. Devido ao emparelhamento intramolecular de bases apresenta uma estrutura em forma de bastonete não ramificado. O RNA antígenômico do HDV é o complementar exato do RNA genômico, possuindo uma ORF para o antígeno delta (representado como o retângulo azul). O HDAg é traduzido a partir do mRNA que por sua vez, possui 800 nt, uma estrutura *cap* na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (adaptado de Alves *et al.*, 2013).

As moléculas de RNA antígenômico são sintetizadas no interior das células hepáticas como produto da replicação do HDV, apresentam polaridade positiva e partilham características idênticas às do RNA genômico, sendo-lhe complementar em termos de composição nucleotídica. O RNA antígenômico não é empacotado nas partículas virais e encontra-se presente nas células do hospedeiro em níveis inferiores quando comparado com os níveis de RNA genômico (Chen *et al.*, 1986).

O genoma de HDV possui uma única ORF da qual derivam duas formas distintas de uma única proteína, o antígeno delta. Na fase inicial da replicação do HDV são transcritos mRNAs com aproximadamente 0.8Kb que codificam para uma das formas do HDAg, a forma pequena (S-HDAg). Esta forma codifica para uma proteína com 195 aminoácidos e aproximadamente 24 KDa (Chang *et al.*, 1988).

Mais tarde, as moléculas de RNA antígenômico sofrem um processo que consiste na conversão do codão terminação UAG para o codão triptofano UGG, prolongando a grelha de leitura por um mecanismo de RNA *editing*. Os RNAs transcritos resultantes deste processo de edição originam moléculas de mRNA as quais, após tradução, conduzem à produção do antígeno delta grande (L-HDAg), uma proteína com 214 aminoácidos e peso molecular de 27 kDa (figura 1.2). Esta modificação pós-

transcricional do RNA antigenómico é levada a cabo por deaminases de adenosina celulares (ADAR) que atuam em RNAs de cadeia dupla (Sato *et al.*, 2001).

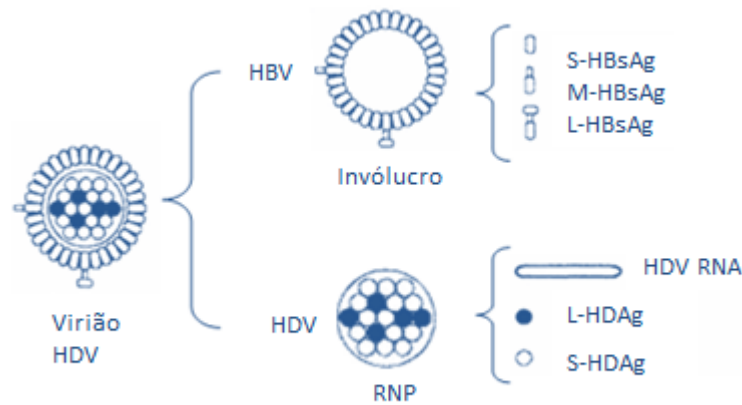


Figura 1.2.: Representação esquemática da partícula do vírus da hepatite delta.

O virião é constituído por dois componentes: invólucro viral, constituído pelas proteínas de superfície do HBV, as proteínas S-HBsAg, M-HBsAg e L-HBsAg; a ribonucleoproteína (RNP), constituída por uma molécula de RNA genómico circular associado aos antígenos delta, S-HDAg e L-HDAg (adaptado de Sureau, 2006).

Ambas as formas de antígeno delta apresentam domínios funcionais específicos, nomeadamente sinais de localização nuclear (NLS), domínios de ligação ao RNA (RBD) e domínios semelhantes a fechos de leucina. Nos 19 aminoácidos adicionais da extremidade C-terminal do L-HDAg identificam-se ainda um sinal de exportação nuclear (NES), (Freitas e Cunha, 2013), e um sinal de farnesilação (*CXXX box*) que funciona como substrato para a atuação das farnesil-transferases celulares (Lee *et al.*, 2001), (figura 1.3).

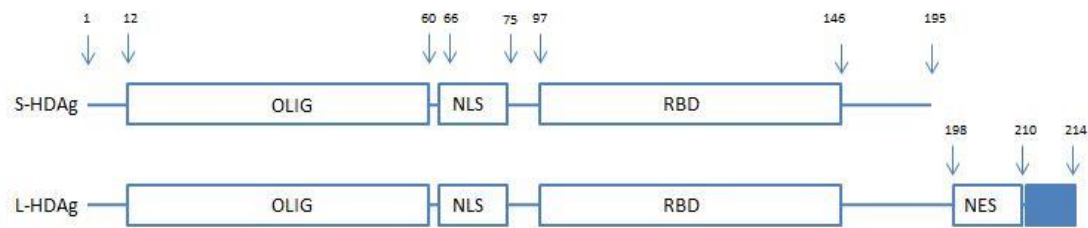


Figura 1.3.: Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em S-HDAg e L-HDAg. Ambas as proteínas contêm na região N-terminal, aminoácido 12 a 60, um domínio de oligomerização (OLIG). Segue-se um domínio, aminoácido 66 a 75, de sinalização nuclear (NLS) e a região central, aminoácido 97 a 146, apresenta um domínio de ligação ao RNA (RBD). O L-HDAg apresenta ainda na extremidade C-terminal, aminoácido 198 a 210, um sinal de exportação nuclear (NES) e um sinal de farnesilação designado por *CXXX box*, representado pelo retângulo azul, (adaptado de Alves *et al.*, 2013).

As farnesil-transferases são enzimas celulares que têm como função a catalisação do processo de farnesilação. A farnesilação é uma forma de prenilação, uma modificação pós-traducional que consiste na adição de um grupo isoprenil a um resíduo de cisteína e que desempenha funções importantes no estabelecimento de interações proteína-proteína e membrana-proteína (Maltese, 1990). A reação de farnesilação ocorre em três etapas sequenciais. Primeiramente, um grupo farnesil de 15 carbonos é adicionado ao resíduo de cisteína. Posteriormente, os três aminoácidos C terminais são removidos, sendo adicionado ao resíduo de cisteína um grupo metil no grupo carboxilo, tornando a proteína mais lipofílica (Shen *et al.*, 2015).

Apesar de muito semelhantes em termos de domínios funcionais, o S-HDAg e o L-HDAg desempenham funções distintas no ciclo infeccioso do vírus. Enquanto que o S-HDAg é essencial na etapa replicativa do HDV, o L-HDAg exerce efeitos inibitórios na replicação viral e promove a formação de novos viriões através da interação com os HBsAgs (Lee *et al.*, 1994).

1.2. Ciclo de Replicação

Em nível de composição proteica, o invólucro do HDV é idêntico ao do vírus do HBV. Assim é possível deduzir que ambos os vírus utilizam os mesmos receptores para entrar na célula. Em 1993, ensaios experimentais de Sureau e colaboradores evidenciaram a importância que a forma grande do HBsAg possui na interação de baixa afinidade com os receptores celulares da superfície hepática, sendo o proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG) o primeiro receptor para esta partícula (Sureau *et al.*, 1993). No entanto, em 2012, Yan e colaboradores demonstraram a inibição da infecção por HBV e HDV através do silenciamento do gene que expressa um cotransportador de ácido biliar, polipeptídeo de transporte taurocolato de sódio (NTCP), manifestando uma afinidade entre este cotransportador e a região pré-S1 do L-HBsAg (Yan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2015).

A replicação do genoma do vírus do HDV é independente de quaisquer funções do HBV. Aquando da descapsidação após entrada do HDV nos hepatócitos, as ribonucleoproteínas são transportadas para o núcleo das células devido à presença dos domínios NLS nos antígenos das partículas virais (Chou *et al.*, 1998). É possível inferir que a replicação ocorre no núcleo das células devido ao facto dos HDAGs e as RNPs do vírus delta apresentarem uma distribuição exclusivamente nuclear (Cunha *et al.*, 1998).

Ambos o RNA genómico e o antigenómico possuem atividade ribozímica, catalisando reações de auto-clivagem de RNA do HDV em locais específicos. A perda de capacidade replicativa do vírus delta *in vivo*, está associada a qualquer mutação interferente neste processo *in vitro* (Macnaughton *et al.*, 1993).

A replicação do HDV segue um mecanismo de círculo rolante, assemelhando-se assim ao processo utilizado pelos viróides das plantas (Lazinski e Taylor, 1995). Tal conclusão é sustentada pelo facto do genoma do vírus delta ser circular e a replicação depender da atividade ribozímica de ambos os RNAs. De acordo com o modelo de círculo rolante, o RNA genómico serve de molde para a síntese das moléculas multiméricas de RNA antigenómico que são auto-clivadas em intervalos precisos libertando monómeros de polaridade oposta de RNA. Estes, por ação de ligases de RNA celulares, são convertidos em antigenomas circulares que servirão de molde para a síntese de novos transcritos de RNA genómico por um mecanismo idêntico (Kuo *et al.*, 1988).

Este modelo é também confirmado pela presença, em biópsias hepáticas e células em cultura, de espécies de RNA do HDV com tamanhos superiores, múltiplos de 1.7 Kb correspondentes às formas intermediárias de replicação (Chen *et al.*, 1986). Porém, a estratégia de replicação utilizada pelo vírus delta constata-se mais complexa. O genoma do HDV, ao contrário dos viróides das plantas, codifica uma proteína. Assim, o modelo de círculo rolante anteriormente proposto para explicar o método de replicação do HDV necessita de ter em consideração a transcrição de mRNAs.

No núcleo das células, o RNA antígenómico do HDV é utilizado como molde para a síntese de RNAs genómicos e multiméricos, assim como para a transcrição de mRNAs. De acordo com o modelo proposto por Hsieh e Taylor, estes dois processos ocorrem separadamente no ciclo de vida do HDV. Primeiramente ocorre a síntese de mRNA poliadenilado. Depois o sinal de poliadenilação dos mRNAs é silenciado por um mecanismo que envolve o S-HDAg e a capacidade que os novos transcritos adquirem de assumir a conformação do tipo bastonete não ramificado. Este silenciamento permite a continuação da transcrição para além do sinal de poliadenilação e a produção de transcritos genómicos multiméricos que são depois processados (Hsieh *et al.*, 1994). Contudo, este modelo apresenta algumas restrições na medida em que sugere que a produção de RNA mensageiro ocorre apenas na fase inicial da replicação viral. Isto não seria favorável à produção do L-HDAg e não estaria de acordo com os dados clínicos que indicam que a produção de L-HDAg ocorre em fases mais tardias do ciclo infeccioso.

Em 1998, Modahl e Lai demonstraram que a síntese de mRNA poliadenilado decorre em paralelo com a síntese do RNA antígenómico e que o aumento dos níveis de expressão de HDAg não inibe a acumulação do mRNA. Estes resultados mostraram-se compatíveis com o ciclo replicativo produtivo, refutando a ideia da transcrição de mRNA ocorrer apenas em fases iniciais do ciclo replicativo (Modahl e Lai, 1998). O vírus delta não codifica nenhuma RNA polimerase, sendo dependente da célula hospedeira para a replicação do seu genoma. Como as células de mamíferos não codificam para RNA polimerases dependentes de RNA coloca-se a hipótese do genoma do HDV ter a capacidade de redirecionar uma RNA polimerase dependente de DNA para transcrever genomas virais.

Vários estudos foram efetuados ao longo dos anos na tentativa de identificar quais as RNA polimerases envolvidas no ciclo replicativo do HDV. Uma fração significativa destes estudos recorreu à utilização de α -amanitina, um conhecido inibidor da RNA polimerase II, mostrando que a transcrição de mRNA e a síntese do RNA genómico são especificamente inibidos na presença desta droga (Fu e Taylor, 1993; Modahl *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2008). A participação da RNA polimerase II no ciclo de vida do HDV não é surpreendente tendo em conta que o mRNA que codifica para o antígeno delta é modificado 5' pela adição da estrutura cap e possui uma cauda poli(A) na extremidade 3', características encontradas nos transcritos produzidos pela RNA polimerase II (RNA pol II).

No que diz respeito à RNA polimerase envolvida na síntese de RNA antigenómico ainda existe alguma controvérsia. A síntese deste RNA é resistente a α -amanitina, sendo possível deduzir que uma enzima celular diferente da RNA polimerase II é responsável pela produção do mesmo. Estudos realizados por Li e colaboradores demonstraram que a formação de RNA genómico é sensível a doses de α -amanitina e tem lugar no nucleoplasma em associação com corpos PML, enquanto que a síntese de RNA antigenómico é resistente a α -amanitina e ocorre nos nucléolos. Foi também observado que a síntese de RNA antigenómico é reduzida em 80% na presença de um anticorpo específico contra um fator de iniciação de RNA polimerase I (Li *et al.*, 2006). Estes resultados apoiam a teoria de que ambas as polimerases I e II participam no ciclo replicativo do HDV.

Em 2001, Yamaguchi e colaboradores demonstraram que o S-HDAg interage diretamente com a RNA polimerase II através de um domínio localizado na sua extremidade C-terminal. Neste trabalho, os autores mostraram ainda que interferir com a ligação do S-HDAg à RNA polimerase II torna a proteína incapaz de suportar a replicação do RNA do vírus delta, sugerindo que o S-HDAg funciona como um factor de transcrição e explicando de que forma o S-HDAg participa nas etapas iniciais da replicação viral (Yamaguchi *et al.*, 2001). Um mesmo tipo de conclusões foi obtido por estudos onde se efectuou uma redistribuição do S-HDAg do nucleoplasma para os nucléolos. Neste caso, a incapacidade de ativação da replicação do genoma do HDV deveu-se ao facto do S-HDAg com localização nucleolar não estabelecer uma interação física com a RNA polimerase II (Huang *et al.*, 2008). Convém também recordar que

para além da RNA polimerase II, o S-HDAg interage com um conjunto de fatores celulares envolvidos no processo de transcrição como por exemplo a histona H1, o fator de transcrição DIPA e o fator de transcrição YY1, entre outros (Greco-Stewart e Pelchat, 2010). Apesar destas interações apoiarem a ideia de que o S-HDAg terá de facto uma função como fator de transcrição, o verdadeiro significado biológico destas interações continua algo elusivo.

1.3. Patologia

O HDV é o vírus hepatotrópico responsável pela forma de doença hepática crónica mais grave. Do ponto de vista histológico, a infeção por HDV é indistinta de outras formas de hepatites virais, com alterações patológicas muito similares e que caracteristicamente compreendem inflamação severa e extensa necrose hepatocelular (Rizzetto *et al.*, 1983).

O quadro clínico característico da infeção pode ser bastante variável, causando hepatite aguda ou crónica. Os primeiros sintomas são observados após o período de incubação, que geralmente varia entre 21 a 49 dias, entre os quais se destacam a fadiga, letargia, anorexia e náuseas. Mais tarde, é frequente o aparecimento de sinais de icterícia, tom amarelado na pele, urina escura e fezes claras acompanhado de um súbito aumento dos níveis de bilirrubina (Farci e Niro, 2012). Nos casos mais graves da infeção aguda, existe a possibilidade de evolução para a forma mais severa de hepatite e consequente falência hepática.

Como referido anteriormente, o HDV necessita da presença do HBV para haver infeção produtiva e transmissão do HDV. O facto do envelope viral do HDV ser composto pelos antigénios de superfície do HBV permite que seja possível esta associação biológica entre ambos. A infeção com o HDV pode ser estabelecida de duas formas, em simultâneo com o HBV, denominando-se co-infeção, ou em indivíduos portadores crónicos de HBV, denominando-se super-infeção (Koh *et al.*, 2019).

Quando estamos perante um caso de infeção simultânea, ou seja, co-infeção aguda, existe a possibilidade de ocorrência de interferência viral. O HDV apresenta a capacidade de inibição da replicação do HBV, reduzindo a síntese do RNA pré-genómico e mRNA codificante de HBsAgs. Isto contribui para a resolução espontânea

da hepatite resultante, o que justifica o facto de em 95% dos casos de co-infecção se observar a eliminação do vírus e a recuperação do paciente (Wu *et al.*, 1995).

O quadro clínico de uma co-infecção aguda demonstra habitualmente uma evolução benigna, apresentando características como a elevação bifásica dos níveis das aminotransferases e bilirrubina. Esta elevação está diretamente relacionada com a expressão sequencial dos dois vírus, sendo o primeiro pico de aumento dos níveis correspondente à replicação do HBV e o segundo do HDV. Ainda assim, convém referir que devido às alterações provocadas pelo HBV em conjunto com o aumento da síntese do HDV, em alguns casos a sintomatologia pode ser agravada resultando no desenvolvimento de formas mais severas da doença e mesmo episódios de hepatite fulminante (Yurdaydin *et al.*, 2019). No caso de co-infecção em que o indivíduo é infetado por ambos os vírus pela mesma via, a evolução do quadro clínico depende da severidade causada pelo HBV. Assim, casos de co-infecção raramente evoluem para a cronicidade, não ultrapassando, em adultos, os 5% semelhantes à percentagem atribuída nos casos de infecção por hepatite B isolada (Botelho-Souza *et al.*, 2017).

No caso de super-infecção pelo HDV em portadores de HBsAgs o prognóstico piora significativamente. Os indivíduos infetados anteriormente pelo HBV proporcionam ao HDV as condições necessárias para a sua replicação, agravando o quadro clínico, histológico e bioquímico. Contrariamente aos casos de co-infecção, a taxa de cronicidade é cerca de 80%, dos quais 40% dos casos evoluem para a cirrose. A super-infecção pelo HDV aumenta três vezes o risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) e duas vezes a mortalidade em pacientes com cirrose compensada (Fattovich *et al.*, 2000).

O CHC é o tumor hepático com origem nos hepatócitos. A elevada taxa de mortalidade de um paciente com este prognóstico deve-se ao diagnóstico tardio e à ausência de tratamento eficaz. Existem vários estudos que apontam as doenças infecciosas, hereditárias ou metabólicas como os principais fatores de risco para a patogénese da doença, sendo o principal fator a cirrose hepática. A cirrose é considerada uma situação pré-cancerígena, caracterizando-se por um processo difuso de fibrose e formação de nódulos, acompanhada de necrose hepatocelular e multiplicação das células do fígado alteradas (Sangiovanni *et al.*, 2006).

Os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular induzido por vírus da hepatite são complexos e envolvem a participação de fatores relacionados com as espécies virais e com fatores do hospedeiro. Concretamente em relação ao HDV, resultados recentes demonstraram a importância do L-HDAg como ativador do fator nuclear kappa B (NF-kB; factor nuclear kappa) e da proteína STAT3 (signal transducers and activators of transcription). Estas duas proteínas têm sido descritas como responsáveis por eventos iniciadores intracelulares desencadeantes da patogénese hepática (Williams *et al.*, 2012). Estes estudos permitiram estabelecer a relação entre a ativação de STAT3 e NF-kB e a sobreprodução de espécies reativas de oxigénio (ROS), que são gerados pelo retículo endoplasmático (RE) como resposta à ativação da NADPH oxidase (NOX). O aumento da produção de ROS está relacionado com a atividade do L-HDAg, devido ao processo de isoprenilação e capacidade de transporte das RNPs sintetizadas para o RE. A ativação do NF-kB também parece ser regulada diretamente pelo L-HDAg via ativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; tumor necrosis factor alpha) (Park *et al.*, 2009).

1.4. Transmissão e epidemiologia do HDV

O HDV partilha os mesmos mecanismos de transmissão descritos na infeção HBV. Em zonas endémicas, a via parental é considerada a principal forma de transmissão do vírus. Por outro lado, em zonas não endémicas, a transmissão ocorre mais frequentemente através de relações sexuais não protegidas e contacto com sangue infetado. A transmissão vertical está diretamente relacionada com a infeção provocada por HBV, ocorrendo em mães portadoras com sinais serológicos evidentes de replicação viral. (Alves *et al.*, 2013).

As mais recentes estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que cerca de 400 milhões de indivíduos no mundo estão infetados cronicamente com HBV, das quais aproximadamente 20 milhões estão co-infetados com HDV. A distribuição do HDV apesar de global, não é uniforme, sendo que as regiões que apresentam maior prevalência são a bacia do Mediterrâneo, ilhas do Pacífico, bacia do Amazonas, África Ocidental e Central, e Ásia Central (Lozano *et al.*, 2012).

A hepatite delta constitui um enorme problema de saúde pública na Amazônia Ocidental, apresentando uns valores de prevalência superior a 85% em pacientes crónicos. Apesar de alterações observadas no padrão epidemiológico, a bacia do Amazonas permanece um importante reservatório para novos surtos de hepatite delta, pois oferece condições sociais, culturais e ambientais que favorecem a transmissão da infeção (Manock *et al.*, 2000).

Zonas consideradas endémicas para o HBV não são necessariamente endémicas para o HDV. Um exemplo desta tendência verifica-se na população Asiática, onde apesar da elevada taxa de prevalência de portadores de HBV, a incidência de infeção pelo HDV limita-se a grupos com comportamentos considerados de alto risco (Huo *et al.*, 2003).

No Sul da Europa, existem regiões consideradas endémicas onde a incidência de infeção por HDV chegou a atingir os 20%. Porém, estudos epidemiológicos mais recentes demonstraram que a infeção por HDV em portadores crónicos de HBV tem vindo a diminuir, como é o caso de Itália. Registou-se uma diminuição de prevalência de hepatite delta de cerca de 50% e uma redução significativa da ocorrência de cirrose associada a esta infeção (Farci, 2003). Esta continua diminuição da taxa de infeção deve-se à vacinação em massa contra o HBV em países Europeus. No caso de Portugal, a vacinação contra o HBV faz parte do Plano Nacional de Vacinação desde o ano 2000. Devido à redução da prevalência da infeção por hepatite delta na Europa perspetivou-se a ideia de que a doença seria erradicada da lista de doenças endémicas, no entanto estudos recentes têm demonstrado um ligeiro aumento desta prevalência no continente europeu, muito provavelmente como consequência de fluxos migratórios oriundos de zonas endémicas (Manesis *et al.*, 2013).

Em Portugal não existem dados estatísticos recentes em relação à prevalência de hepatite delta, no entanto esta é considerada pouco frequente, atingindo principalmente os grupos de alto risco. Os únicos estudos, já realizados nos anos 80, indicavam que a prevalência acompanhou o aumento do número de toxicodependentes na sociedade portuguesa, registando-se uma taxa de 17% em portadores crónicos de HBV (Ramalho *et al.*, 1987).

Tendo por base a variabilidade genética no HDV, atualmente é possível identificar oito tipos de genótipos (Hughes *et al.*, 2011; figura 1.4). O genótipo mais frequente é o

genótipo I, que se encontra associado a doença crónica com capacidade para rapidamente progredir para cirrose, e que se distribui nos Estados Unidos da América, Europa, Médio Oriente e norte de África. O genótipo II caracteriza-se por causar uma forma da doença moderada e ocorre maioritariamente no Japão e Taiwan. Já o genótipo III está associado ao desenvolvimento de hepatites fulminantes na América do Sul. Finalmente, os genótipos IV a VIII são identificados principalmente no continente Africano (Hughes *et al.*, 2011).

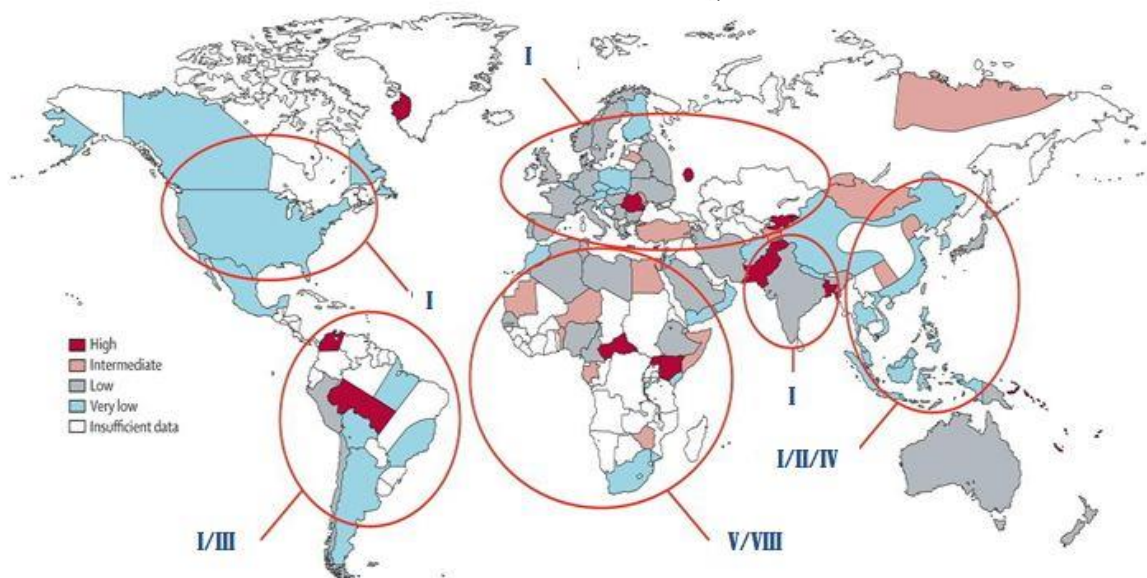


Figura 1.4.: Prevalência mundial do HDV e distribuição geográfica dos genótipos. O genótipo mais frequente do HDV é o genótipo I, encontra-se distribuído mundialmente, principalmente na Europa, Médio Oriente e América do Norte. Na Ásia Oriental o genótipo observado é o genótipo II do HDV. O genótipo III ocorre exclusivamente na América do Sul, enquanto os genótipos IV-VIII são encontrados sobretudo no continente Africano, (adaptado de Hughes *et al.*, 2011).

1.5. Tratamento

A melhor forma de redução de prevalência e incidência pelo HDV é a vacinação contra o HBV, no entanto a imunização mostra-se eficaz apenas em casos de co-infecção. No caso de indivíduos portadores crônicos do HBV, residentes em áreas endêmicas de infecção por HDV, a imunização ativa é ineficaz e a infecção pelo HDV continua a representar um importante desafio. A imunização com vacinas de DNA que codificam para o HDAg e a utilização direta do HDAg não demonstraram ser eficientes na proteção contra a infecção provocada pelo HDV (Fiedler e Roggendorf, 2006).

Para além de ter como principal objetivo a eliminação do vírus e a inibição da replicação, o tratamento da infecção pelo HDV pretende diminuir os processos inflamatórios crônicos do fígado, reduzindo o risco de desenvolvimento de cirrose ou hepatocarcinoma. O diagnóstico precoce e início do tratamento, assim como a dosagem do fármaco e duração do tratamento são muito importantes no que diz respeito à obtenção de uma boa resposta clínica à infecção por parte do paciente. A resposta do mesmo ao tratamento é avaliada pela normalização dos valores de alanina-transaminases (ALT; resposta bioquímica), eliminação do RNA do vírus no soro (resposta virológica) e redução dos processos necro-inflamatórios hepáticos (Hsieh *et al.*, 2006).

As opções terapêuticas para infecções crônicas de HDV são escassas e é importante realçar a inexistência de uma terapia eficaz para infecções crônicas de HBV/HDV. Atualmente, a única opção reconhecida para o tratamento de hepatite delta é o interferão- α (IFN- α). No início do século, ensaios clínicos foram realizados a fim de demonstrar os efeitos benéficos da terapêutica em doentes crônicos, no entanto, apesar dos resultados promissores, a taxa de recidiva foi elevada após a interrupção do tratamento (Farci *et al.*, 2004; Niro *et al.*, 2005) . Um ensaio clínico em particular demonstrou que 50% dos doentes tratados durante 48 semanas com 9 milhões de unidades (MIU) de IFN- α apresentavam normalização dos valores bioquímicos, virológicos e histológicos. Contudo, após interrupção do tratamento, apenas 21% dos doentes apresentavam marcadores satisfatórios (Farci *et al.*, 1994) . O mesmo tipo de resultados transitórios foram observados em estudos realizados com doses ainda mais elevadas de IFN- α (Madejón *et al.*, 1998). É importante destacar que o IFN- α apresenta capacidades imunomoduladoras e anti-proliferativas e estes efeitos

imunomoduladores podem não apenas agravar doenças pré-existentes, como induzir o aparecimento de doenças autoimunes em pacientes tratados (Aslam *et al.*, 2015).

A única terapia que demonstrou alguma atividade antiviral específica contra o HDV consiste em IFN- α modificado por polietilenoglicol (PEG). Contudo, a redução do título viral é apenas observada em 15%-40% dos doentes, sendo necessárias administrações prolongadas que conduzem frequentemente ao aparecimento de efeitos adversos tais como a fadiga, perda de peso e distúrbios psiquiátricos (Heller *et al.*, 2014). O recurso a antivirais inibidores de replicação do HBV, como a lamivudina, famciclovir e adefovir, usados em monoterapia ou combinados com o IFN- α , não demonstraram utilidade quanto ao título viral de HDV, não evidenciando capacidade de intervir no ciclo replicativo do mesmo (Yurdaydin *et al.*, 2008).

Sendo o HDV um vírus de genoma de RNA, com uma única proteína viral, este torna-se um excelente modelo experimental para estudo de aspectos fundamentais da interação hospedeiro-agente patogênico e da biologia de RNA. O desenvolvimento de terapias eficazes tem sido dificultado pela incapacidade de identificação de atividades enzimáticas associadas aos dois tipos de antígenos delta produzidos. Tendo em consideração que as interações dos antígenos do HDV com os antígenos de superfície do HBV são essenciais para a formação e propagação de novas partículas de HDV, a ideia de interferir com estas interações surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas terapias específicas.

Várias alterações pós-traducionais têm sido descritas em ambos os antígenos delta e algumas destas alterações apresentam funções importantes para o ciclo de vida do HDV (Cunha *et al.*, 2015). O exemplo mais paradigmático destas modificações é a prenilação de um resíduo de cisteína presente na extremidade carboxilica da forma grande do antígeno de hepatite delta. A prenilação é catalisada pelas farnesil-transferases e envolve a transferência de um grupo farnesil para a cisteína na posição 211 do antígeno grande, tornando-o mais lipofílico, facilitando a interação com HBsAgs para a formação do envelope viral (Shen *et al.*, 2015). O desenvolvimento de inibidores de prenilação surge assim como uma estratégia promissora no sentido de gerar novas opções farmacológicas capazes de intervir no ciclo de vida do HDV, interferindo com a sua replicação e evitando a propagação da infecção.

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstraram uma redução significativa da produção de partículas virais de HDV na presença de inibidores de prenilação tais como FTI-277, FTI-2153 e BZA-5B (Bordier *et al.*, 2002; Bordier *et al.*, 2003). Estes inibidores, apesar de apresentarem especificidade para o HDV pois interferiram na prenilação do L-HDAg não se registando alterações em outras proteínas celulares que são igualmente alvo desta modificação, exibiram como desvantagem uma elevada toxicidade em ensaios de viabilidade celular. Ao invés, outros inibidores como o ABT-100 apresentam menor toxicidade celular, demonstrando a sua potencialidade como supressor do desenvolvimento de tumores hepáticos. No entanto, este último parece ser menos específico, carecendo de uma investigação mais detalhada na eventual interferência com a biologia do HDV (Carlioni *et al.*, 2005).

Atualmente, dos FTI recentemente desenvolvidos, o que se tem demonstrado mais promissor é o Lonafarnib, um inibidor de farnesil-transferase inicialmente utilizado em ensaios clínicos em humanos para o tratamento de progeria (Gordon *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2013; Gordon *et al.*, 2014). Progeria é uma doença genética extremamente rara, caracterizada por mutações no gene da lamina A, em que os sintomas se assemelham ao envelhecimento em idades muito precoces (Kubben e Misteli, 2017).

No caso do HDV, um estudo recente demonstrou que o Lonafarnib reduz significativamente os níveis virais serológicos quando utilizado como tratamento em doentes com infeção HDV crónica (Koh *et al.*, 2015). Neste estudo registou-se um decréscimo dos níveis de HDV numa terapia com duração de 28 dias utilizando diferentes doses do fármaco em dois grupos de doentes. Num primeiro grupo, a dose consistiu numa toma de 100 mg duas vezes por dia e num segundo grupo consistiu numa toma bi-diária de 200 mg. Metade dos pacientes do grupo com uma dose mais elevada atingiu um decréscimo de $-2 \log$ IU/ml quando comparado com o grupo placebo. Suportando a ideia de que o Lonafarnib apresenta eficácia antiviral contra o HDV, dois terços dos pacientes do grupo 2 sofreram um aumento da carga viral acompanhado por um pico no ALT após interrupção da terapia. Apesar de ter sido a primeira demonstração de aumento da carga viral após interrupção do tratamento com inibidores de prenilação, este fenómeno já tinha sido observado em estudos baseados na utilização de interferão- α (Yurdaydin *et al.*, 2008). Convém referir que, apesar do estudo realizado se basear apenas em doentes com genótipo de HDV tipo I, os autores

sugerem que os resultados obtidos em doentes com outros genótipos de HDV serão comparáveis.

1.6. Objetivo principal

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar os mecanismos de ação do Lonafarnib de modo a avaliar a sua eficácia como possível abordagem terapêutica específica para as infeções por HDV.

1.6.1. Objetivos específicos

Por forma a alcançar o objetivo principal, definimos quatro objetivos específicos:

1. Averiguar a citotoxicidade do Lonafarnib em linhas celulares humanas derivadas de hepatocarcinoma;
2. Analisar a capacidade do Lonafarnib em interferir no ciclo de vida do HDV em linhas celulares humanas;
3. Determinar a influência do Lonafarnib na estabilidade dos antigénios delta;
4. Analisar o efeito do Lonafarnib a expressão do oncogene STAT3, associado ao desenvolvimento e progressão de carcinoma hepatocelular induzido pela infeção HDV.

2. Materiais e Métodos

2.1. Linhas Celulares

Para a realização deste estudo, recorreu-se à utilização de linhas celulares humanas Huh7 e Huh7D12. Esta última linha celular resulta da transfeção estável da linha celular Huh7 com um plasmídeo que contém um trímero do cDNA completo do HDV, pSVL (D3). Este plasmídeo foi construído através de uma transcrição reversa do RNA total do fígado de uma marmota infetada com HDV, clonando-o no vetor de expressão eucariota pSVL (Kuo *et al.*, 1988). Após transfeção estável obtemos uma linha celular com várias cópias de cDNA do HDV integrados no seu genoma, expressando ambos os antígenos delta e todas as moléculas de RNA associadas ao ciclo de vida do HDV (Cunha *et al.*, 1998).

2.1.1. Cultura Celular

A linha celular Huh7D12 foi propagada em monocamada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), com L-glutamina e NaHCO₃, enriquecido com soro bovino fetal (FBS; Fetal Bovine Serum; GIBCO) com uma concentração final de 10% (v/v) e suplementado com 200µg/ml de Geneticina (G418; Sigma Aldrich).

A linha celular Huh-7 foi crescida em monocamada e cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS;GIBCO) e com 1X Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich).

2.1.2. Descongelção das células

Ambas as linhas celulares são crio-conservadas a -80°C numa arca vertical de hidrogénio líquido (SANYO, Ultra-low temperature freezer modelo: MDF-U3086S). A descongelção foi feita utilizando um banho termoestático a 37°C (Medingen, modelo: W12). O crio-tubo (Sarstedt) foi aquecido, sem submergir, até à total descongelção do meio de crio-conservação. A totalidade do volume de células foi inoculado em 10 ml de meio completo colocado previamente num frasco de cultura de 75 cm² com filtro na tampa (Sarstedt). Após 24h de incubação a 37°C e 5% de CO₂ (Nuair, US autoflow), o meio foi totalmente retirado e substituído por meio novo.

2.1.3. Manutenção da cultura celular

As células Huh7D12 e Huh7 foram mantidas em frascos de cultura de 75cm² de área (Sarstedt), contendo o meio de cultura descrito anteriormente. Estes frascos de cultura foram mantidos a 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂. O controlo de uma eventual contaminação foi regularmente efetuado.

Por forma a manter a linha celular Huh7D12 e Huh7, sempre que foi observada uma confluência superior a 90%, as células foram removidas do frasco de cultura e passadas para um novo frasco, a uma densidade inferior. Este processo foi geralmente repetido a cada três dias.

O processo de manutenção da cultura celular inclui a remoção do meio de cultura, seguido de uma lavagem com uma solução salina tamponada de fosfatos (PBS 1X) e posterior incubação a 37°C durante 1 a 2 minutos com 0,5ml de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma-Aldrich). Este passo denomina-se tripsinização e tem como objetivo a separação entre células, assim como a separação das células da superfície dos frascos de cultura.

A inativação da tripsinização foi efetuada através de diluição, adicionando 9,5 ml de meio de cultura, perfazendo um volume total de 10 ml, no qual as células foram ressuspensas e transferidas para um novo frasco de cultura na diluição pretendida.

2.1.4. Cultura de células em placas de seis poços

As células foram crescidas em placas de seis poços, cada poço com 3,5 cm de diâmetro (Sarstedt). Para a extração de RNA total utilizou-se uma confluência entre 70 a 90%, enquanto que para ensaios de transfeção se utilizou uma confluência entre 60 a 80%. Após lavagem, tripsinização e ressuspensão das células em cultura, as placas foram preparadas com um volume final de 1,5 ml. Por poço inoculou-se 0,3 a 0,5 ml de suspensão celular em meio completo. As placas foram incubadas durante 24 a 48h a 37°C e 5% CO₂ (Nuair, US autoflow), até ser atingida a confluência desejada.

2.2. Transformação bacteriana

Os plasmídeos utilizados neste estudo são vetores de expressão eucariotas que contêm um gene de resistência à ampicilina. Para a transformação foram utilizadas *E. coli* termo competentes DH5 α . A 100 μ l de bactérias adicionaram-se 10 ng de DNA plasmídico. O tubo de transformação foi colocado em gelo durante 30 minutos e de seguida foi submetido a choque térmico a 42°C durante 45 segundos (Medingen, modelo: W 12). O tubo foi então arrefecido em gelo durante 1 minuto, suplementado com 900 μ l de meio Luria-Bertani (LB; Gibco) e incubado a 37°C durante 1 hora com agitação de 200 rpm. As transformações foram plaqueadas em placas de LB agar (Invitrogen) suplementado com ampicilina (Thermo scientific). Após incubação a 37°C e agitação de 200 rpm durante a noite, as culturas foram utilizadas para extração do DNA plasmídico com recurso a *kits* comerciais (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

2.3. Transfeção transitória de células Huh7

A transfeção transitória de células Huh7 foi efetuada utilizando o reagente de transfeção FUGENE 6 (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, 3 μ l de FUGENE 6 foram diluídos em 100 μ l de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e esta mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Outro tubo foi preparado contendo 1 μ g de DNA plasmídico sobre o qual foi colocado o meio de transfeção. Após nova incubação durante 15 minutos a temperatura ambiente, a mistura final foi distribuída gota a gota pela área dos poços das placas de seis poços. Posteriormente, incubaram-se a 37°C e 5% CO₂ (Nuair, US autoflow) durante 24 horas.

2.3.1. Extração de RNA total

Para extração e purificação do RNA total, foi utilizado o RNeasy Mini *kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, removeu-se o meio de cultura das células e procedeu-se à lavagem das mesmas com 1 ml de PBS 1X. Após a remoção da solução de lavagem, as células foram lisadas pela adição de 350 µl da solução Buffer RLT suplementada com β-Mercaptoetanol.

O conteúdo foi em seguida transferido para uma coluna QIAshredder (Qiagen) e centrifugada durante 2 minutos a 13 000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Seguidamente, adicionou-se 350 µl de etanol 70% e homogeneizou-se a amostra.

A amostra foi transferida para uma coluna RNeasy Mini e centrifugada durante 15 segundos a 10 000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Após centrifugação, foram adicionados 700 µl de Buffer RW1, centrifugando novamente por 20 segundos a 10 000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). De seguida, procedeu-se a duas lavagens da coluna com 500 µl de Buffer RPE. Por último adicionou-se à coluna 40 µl de água livre de RNases e centrifugou-se 1 minuto a 10 000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf).

2.3.2. Quantificação de RNA e DNA

A quantificação dos RNAs e DNAs purificados foi feita através do espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo scientific). O grau de pureza foi avaliado pela razão entre a absorvância medida a 260 nm e 280 nm.

2.3.3. Síntese de DNA complementar

A síntese de cDNA foi realizada recorrendo ao kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYTech), a partir do RNA extraído anteriormente. A cada amostra, foi adicionado 10 µl de NZYRT Master Mix e 2 µl de NZYRT Enzyme Mix. Seguidamente, tendo em conta os valores obtidos a partir da quantificação de RNA, foi adicionado o correspondente a 1 µg de RNA e água livre de nucleases de forma a perfazer um total de 8 µl. Após homogeneização, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após incubação, foram colocadas num termociclador MJ mini (BioRad) durante 30 minutos a 50°C, seguidos de 5 minutos a 85°C. Terminados os 5 minutos, adicionou-se 1 µl de NZY Rnase H e colocou-se novamente as amostras no termociclador por um período de 20 minutos a 37°C.

2.3.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

As reações foram realizadas num volume final de 25 µl. Cada reação continha 12,5 µl de Taq 2x Master Mix, 9,5 µl de água livre de nucleases, 0,5 µl de cada *primer*, forward e reverse, e 2 µl do cDNA obtido. Os primers utilizados nas reações de PCR encontram-se descritos na tabela 1. Excepto quando indicado o contrário os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados no laboratório utilizando o *software* Primer3 (v.0.4.0) (Untergasser *et al.*, 2012). Como controlo negativo da reação PCR, foram preparados tubos contendo o mesmo conteúdo que as reações anteriormente descritas, substituindo os 2 µl de cDNA por 2 µl de água livre de nucleases.

A Red Taq Master Polymerase Master Mix (VWR) contém 0,2 U/ µl de Taq Polymerase, MgCl₂ numa concentração final de 1,5 mM e dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). As reações de PCR foram realizadas num termociclador GenePro (Bioer) nas etapas descritas na tabela 2.

Gene	Exão (ex.)	Seqüência	Tamanho - pb
Expressão do HDV (Freitas <i>et al.</i> , 2012)	Fwd	GGACCCCTTCAGCGAACA	100
	Rev	CCTAGCATCTCCTCCTATCGCTAT	
U6	Fwd	CTCGCTTCGGCAGCACA	100
	Rev	AACGCTTCACGAATTTGCGT	
Ciclina D1	Fwd ex.4	CCTGTCCTACTACCGCCTCA	165
	Rev ex.5	TCCTCCTCTTCCTCCTCCTC	
STAT3	Fwd ex.3	TCCTGGGAGAGATTGACCAG	184
	Rev ex.4	GTGGCTGCAGTCTGTAGAAGG	

Tabela 1.: Primers utilizados nas reações de PCR. Seqüência 5'-3' dos primers utilizados para amplificação dos diferentes genes por PCR. Indicam-se também os exões onde se localizam os primers, assim como o tamanho do produto de PCR obtido (em pares de bases – pb).

Etapas do PCR	Nº de ciclos	Duração (s)	Temperatura (°C)
Desnaturação inicial	1	300	95
Desnaturação	29	60	95
Hibridação		60	56
Extensão		60	72
Extensão final	1	300	72
Armazenamento	1	Tempo indeterminado	4

Tabela 2.: Etapas realizadas nas reações de PCR, discriminando a temperatura e duração das diferentes etapas. Todas as PCRs foram efetuadas seguindo estas condições, tanto a nível de temperatura como de duração.

2.3.5. Eletroforese em gel de agarose

Para avaliação dos resultados das reações de PCR, os produtos das reações foram submetidos a uma eletroforese em gel de Agarose (2%) em tampão Tris-acetato EDTA (TAE). Para a preparação do gel, dissolveu-se, recorrendo a um forno microondas, 2 gramas de agarose em 100 ml de TAE 1x. Após arrefecimento da solução, adicionou-se 5 µl de corante RedGel (Biotium). A solução foi posteriormente vertida num molde com o número de poços adequado. Após solidificação, foram adicionados 12,5 µl de cada reação de PCR aos poços do gel, juntamente com 1,5 µl de marcador Low Range DNA Ladder (Thermo scientific) em cada uma das extremidades. A eletroforese foi realizada a 80 V durante aproximadamente 1h30. Os resultados obtidos foram verificados utilizando um transiluminador para captação de imagens com recurso ao *software* QuantityOne 4.6.1 (BioRad).

2.3.6. Preparação de extratos de proteínas e Western Blot

Células crescidas em placas de petri de 3,5 cm foram lisadas utilizando SDS sample buffer 1x (Invitrogen) e benzonase (Sigma-Aldrich). Após lavagem das células com 1 ml de PBS 1x, foi adicionada a mistura de lise composta por 96 µl de SDS 1X, 2 µl de benzonase e 2 µl de 0.5M MgCl₂. Após raspagem mecânica do fundo da placa, a solução foi aspirada e colocada num tubo de eppendorf que foi incubado num banho seco a 95°C durante 5 minutos (Clever scientific). As amostras proteicas foram seguidamente separadas em géis de SDS-PAGE 10% (BioRad) e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema semi-seco (BioRad). Após transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS 1X contendo 5% de leite em pó magro durante 1 hora. Seguidamente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários diluídos em PBS 1X contendo 2,5% de leite em pó magro durante 2 horas, lavadas em PBS 1X com 0,05% de detergente Tween-20 durante 45 minutos e incubadas com os respetivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano diluídos 1:3000 em PBS 1X com 2,5% de leite em pó magro. Após uma nova lavagem em PBS 1X com 0,05% de detergente Tween-20 durante 1 hora, a revelação foi realizada com um sistema de quimioluminescência (ECL; Promega) numa câmara escura. Neste estudo foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo

policlonal B3 anti-HDAg (1:500; Santa Cruz), anticorpo monoclonal anti-hnRNP A2/B1 (1:500; Santa Cruz), anticorpo monoclonal anti-hnRNP-K (1:200; Santa Cruz), anticorpo monoclonal anti-STAT3 (1:200; Santa Cruz) e anticorpo monoclonal anti-CCND1 (1:200; Santa Cruz).

2.3.7. Fármacos

No decorrer deste estudo foram utilizados os seguintes fármacos: FTI-277 (Sigma-Aldrich), fármacos derivados do inibidor FTI-277, denominados compostos A e B, e Lonafarnib (Sigma-Aldrich). Na preparação da solução de uso, todos os fármacos foram dissolvidos em DMSO numa concentração final de 10 mM. As soluções foram homogeneizadas e guardadas a -20°C.

3. Resultados

3.1. Análise dos efeitos do fármaco Lonafarnib em termos de viabilidade celular

O processo de montagem das partículas virais do vírus da hepatite delta é determinado pela prenilação de um resíduo de cisteína presente na extremidade carboxílica da forma maior do antígeno de hepatite delta. Esta modificação pós-traducional envolve a transferência de um grupo farnesil para a cisteína na posição 211 do L-HDAg tornando o antígeno mais lipofílico, facilitando a interação com os antígenos de superfície do vírus da hepatite B.

Uma estratégia para gerar novas opções terapêuticas para o HDV é o desenvolvimento e utilização de inibidores de prenilação capazes de intervir na ocorrência desta modificação fundamental do ciclo de vida do HDV. Alguns estudos *in vitro* previamente realizados demonstraram uma redução acentuada e significativa da produção de partículas virais de HDV na presença do inibidor de prenilação FTI-277 (Bordier *et al.*, 2002; Bordier *et al.*, 2003). O inibidor FTI-277 mostrou bastante especificidade, interferindo na prenilação do L-HDAg mas não de outras proteínas celulares analisadas, apresentando no entanto uma elevada toxicidade em ensaios de viabilidade celular, gerando a necessidade de sintetizar novos compostos na tentativa de obter um fármaco menos tóxico para as células.

Em trabalhos prévios realizados no nosso laboratório, desenvolveram-se variantes do composto FTI-277 a fim de tentar obter um composto menos tóxico para as células. Foram analisados os efeitos de dois compostos em termos de viabilidade celular, sintetizados a partir do inibidor, denominados compostos A e B. Os resultados obtidos demonstraram que as concentrações superiores a 2 μ M, tanto o FTI-277 como os compostos A e B interferiam na viabilidade celular. No entanto para concentrações inferiores, o efeito tóxico do inibidor comercial FTI-277 era mais evidente em comparação com os compostos sintetizados.

Tendo em conta a importância das concentrações de fármacos do ponto de vista terapêutico a fim de diminuir os potenciais efeitos secundários, começámos este trabalho por executar os ensaios de viabilidade utilizando o fármaco Lonafarnib e os restantes inibidores de farnesilação descritos anteriormente como termo de comparação.

Células humanas Huh7D12, que expressam constitutivamente ambos os antígenos delta e todas as moléculas de RNA associadas ao ciclo de vida do HDV,

foram colocadas a crescer em placas de 96 poços e incubadas durante 48h com concentrações crescentes dos inibidores anteriormente descritos. Após incubação, a viabilidade celular foi analisada utilizando o *CellTiter-Blue Cell Viability Assay Kit*. Utilizando este *kit*, o estudo da viabilidade celular baseia-se num processo metabólico que compreende a adição de um indicador redox fluorogénico (resazurina) à cultura celular. A resazurina, um composto azul não fluorescente, irá atuar como aceitador intermediário de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial. Esta reação irá ser acompanhada pela alteração da cor, com passagem de azul não fluorescente (forma oxidada) para rosa fluorescente (resorufina).

A figura 3.1 demonstra a placa *multiwell* de 96 poços com as amostras redistribuídas no momento imediato após a adição do indicador fluorogénico (resazurina). Observa-se a coloração azul característica e indicadora da presença da resazurina que irá ser incorporada pelas células. Um total de três ensaios independentes foi efetuado, com triplicados técnicos em cada ensaio, analisando os efeitos dos fármacos em termos de viabilidade celular em concentrações farmacológicas crescentes, entre 2 μM e 20 μM .

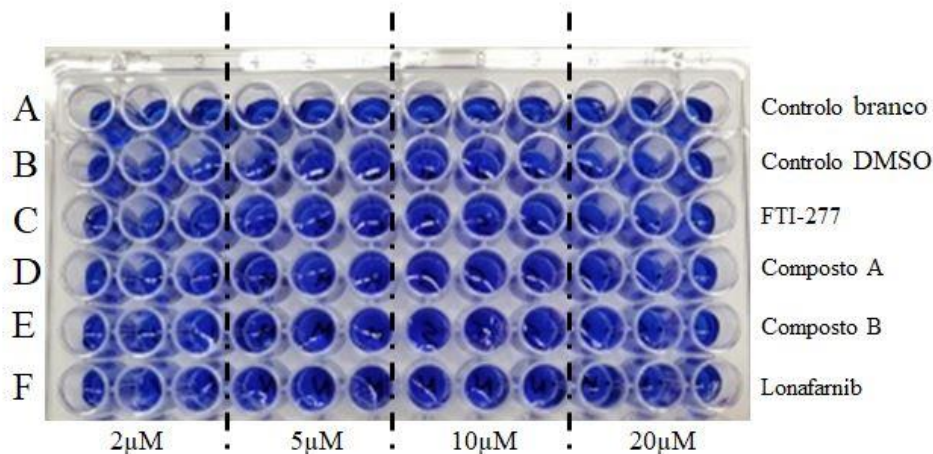


Figura 3.1.: Representação da placa de 96 poços, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular. Linha A corresponde ao meio da cultura RPMI-1640 num volume de 100 μl . Linha B corresponde a células Huh7D12 incubadas com DMSO. Linha C corresponde a células Huh7D12 incubadas com o inibidor de farnesil-transferases FTI-277. Linha D corresponde a células Huh7D12 incubadas com o composto A. Linha E corresponde a células Huh7D12 incubadas com o composto B. Linha F corresponde a células Huh7D12 incubadas com Lonafarnib. Após incubação com fármacos durante 48h, por cada poço foram adicionados 20 μl do reagente disponível no *kit*. Todos os fármacos foram incubados numa concentração de 2 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM . O mesmo ensaio foi realizado em triplicado para cada uma das concentrações.

Após incubação da resazurina durante 4h, foi observada a mudança de cor dos compostos, indicativo da ocorrência da reação redox. A figura 3.2 representa a placa *multiwell* de 96 poços ao fim das 4h de incubação a 37°C.

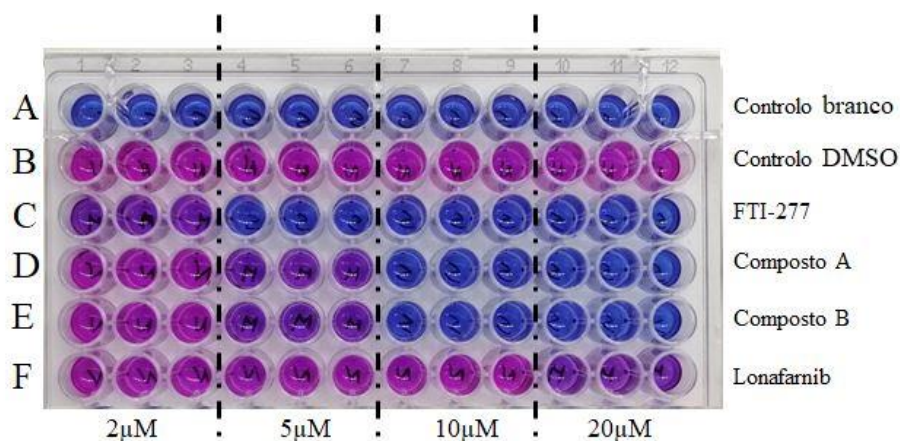


Figura 3.2.: Representação da placa de 96 poços, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular. Linha A corresponde ao meio da cultura RPMI-1640 num volume de 100μl. Linha B corresponde a células Huh7D12 incubadas com DMSO. Linha C corresponde a células Huh7D12 incubadas com o inibidor de farnesil-transferases FTI-277. Linha D corresponde a células Huh7D12 incubadas com o composto A. Linha E corresponde a células Huh7D12 incubadas com o composto B. Linha F corresponde a células Huh7D12 incubadas com Lonafarnib. Todos os fármacos foram incubados numa concentração de 2μM, 5μM, 10μM e 20μM. O mesmo ensaio foi realizado em triplicado para cada uma das concentrações.

Posteriormente, as placas foram lidas num espectrofluorimetro analisando-se a absorvância nos comprimentos de onda de 560 nm (espectro de emissão) a 590 nm (espectro de excitação). Após quantificação, os resultados foram normalizados em relação ao controlo DMSO a fim de facilitar a análise dos valores médios do índice de viabilidade celular das células Huh7D12, figura 3.3.

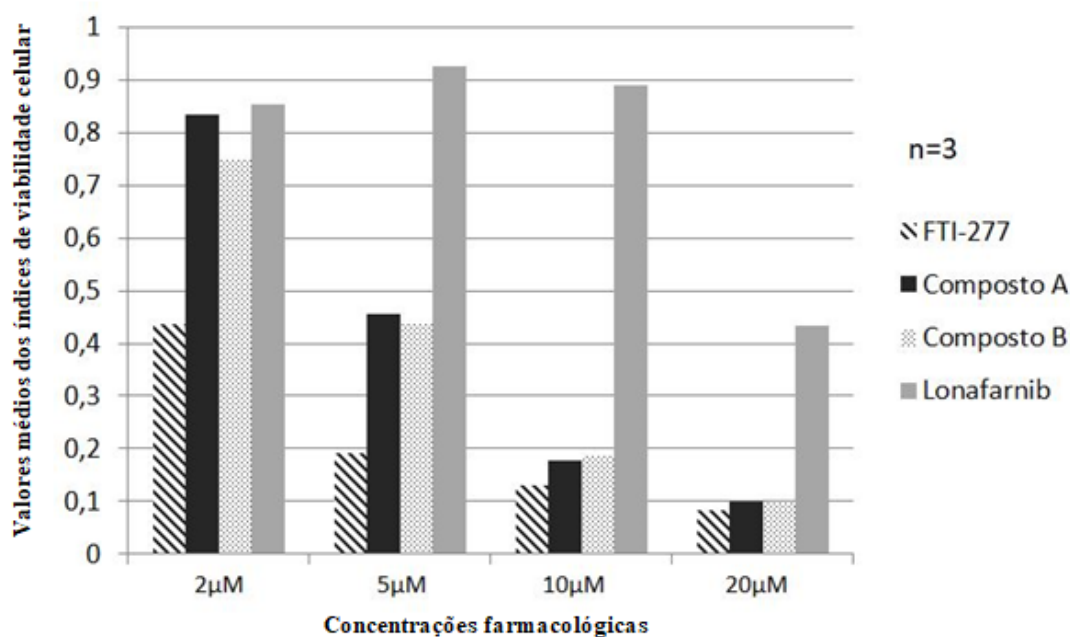


Figura 3.3.: Valores médios dos índices de viabilidade celular das células Huh7D12. Análise dos efeitos dos compostos FTI-277, composto A, composto B e Lonafarnib em termos de viabilidade celular em concentrações farmacológicas crescentes entre 2µM e 20µM. Os resultados apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

Como se pode observar na figura 3.3, na concentração de 2 µM, apenas o inibidor FTI-277 interfere com a viabilidade das células Huh7D12. Em oposição, nas concentrações de 5 µM e 10 µM, o efeito tóxico do FTI-277 e dos compostos A e B é mais evidente em comparação com o Lonafarnib. Por último, na concentração de 20 µM, todos os inibidores mostram um efeito marcado na viabilidade celular das células Huh7D12. Em conclusão, com este ensaio demonstramos que o Lonafarnib apresenta menor toxicidade para as células do que o inibidor comercial FTI-277 e seus derivados.

3.2. Efeito do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib na expressão do RNA genómico do HDV

Após termos demonstrado que as células Huh7D12 toleravam incubações com o Lonafarnib a concentrações até 10 μ M, decidimos avaliar o potencial deste fármaco em intervir no ciclo biológico do vírus da hepatite delta. No passado, o nosso laboratório demonstrou que a incubação de células Huh7D12 com os compostos A e B induzia a um aumento significativo da expressão do RNA genómico do HDV. Esta observação levou-nos a questionar se o mesmo efeito se observaria utilizando o Lonafarnib.

Para isso, células Huh7D12 foram colocadas em placas de cultura 35x10 mm e incubadas, durante 48h, com 2 μ M de Lonafarnib e dos compostos A e B para comparação.

Após incubação das células Huh7D12 com os três inibidores em estudo, realizou-se a extração de RNA total, seguido da síntese do cDNA e por fim, avaliou-se os níveis de expressão do RNA genómico do HDV através da reação PCR utilizando um par de *primers* específicos para o genoma do HDV, descrito anteriormente (Freitas *et al.*, 2012). Recorremos à utilização de um PCR adicional utilizando um par de *primers* específicos para U6, um controlo endógeno que serve para testar a ausência de erros na quantidade de RNA utilizado na reação de cDNA e na quantidade utilizada no PCR.

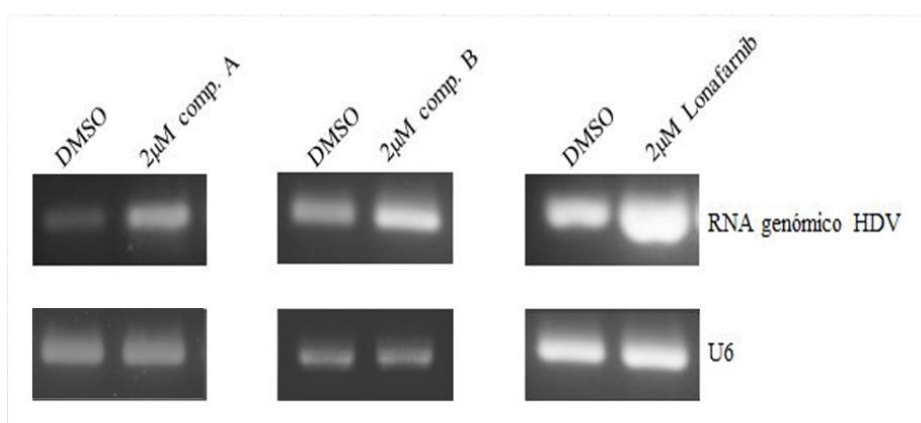


Figura 3.4.: Influência dos compostos A, B e Lonafarnib nos níveis de expressão do RNA genómico do HDV. Níveis de RNA genómico do HDV foram analisados por PCR e corridos em géis de agarose de 2%. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO. A segunda banda de cada painel corresponde ao composto A, composto B e inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib, todos utilizados numa concentração de 2 μ M.

Os resultados da figura 3.4 demonstram que, comparativamente ao controlo correspondente às células incubadas com DMSO, a incubação das células Huh7D12 com os três inibidores de farnesil-transferases conduzem a um aumento dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV, sendo que o efeito é mais visível quando o Lonafarnib é utilizado. Em contraste com o aumento da expressão do RNA genómico do HDV, não se verificam alterações nos níveis de expressão do transcrito do U6.

Dado que o Lonafarnib apresentou uma menor citotoxicidade nos ensaios de viabilidade descritos no ponto 3.1, incubámos as células Huh7D12 durante 48h com concentrações crescentes de Lonafarnib (2 μ M, 5 μ M e 10 μ M). Os resultados demonstram um aumento proporcional dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV em relação ao aumento da dose de Lonafarnib, comparativamente ao controlo correspondente à ausência de fármaco (figura 3.5).

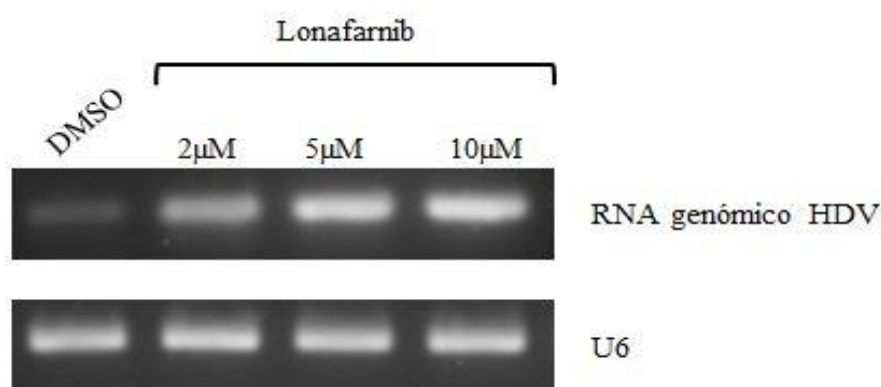


Figura 3.5.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão do RNA genómico do HDV. Níveis de RNA genómico do HDV foram analisados por PCR e corridos em géis de agarose de 2%. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO. As bandas seguintes de cada painel correspondem a concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (2 μ M, 5 μ M e 10 μ M).

Com os resultados descritos nas figuras 3.4 e 3.5, demonstrámos que o Lonafarnib tem a capacidade de promover aumento da expressão do RNA genómico do HDV nas células Huh7D12, um efeito que é dependente da dose de fármaco utilizada.

3.3. Efeito do Lonafarnib na expressão dos antígenos do HDV

Após termos demonstrado que os níveis de RNA genômico do HDV aumentavam com concentrações crescentes de Lonafarnib, decidimos averiguar se este fármaco afetaria também os níveis de expressão dos antígenos do HDV.

Utilizando o mesmo procedimento experimental de incubação acima citado, extraímos as proteínas totais de células Huh7D12 incubadas com concentrações crescentes de Lonafarnib. Estes extratos foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com anticorpos anti-HDAg (B3), um soro policlonal que reconhece epítomos comuns em ambos os antígenos delta (Tavanez et al., 2002), e um anticorpo monoclonal anti-hnRNP A2/B1, que serve de controlo para a quantidade de proteínas utilizadas no ensaio (figura 3.6).

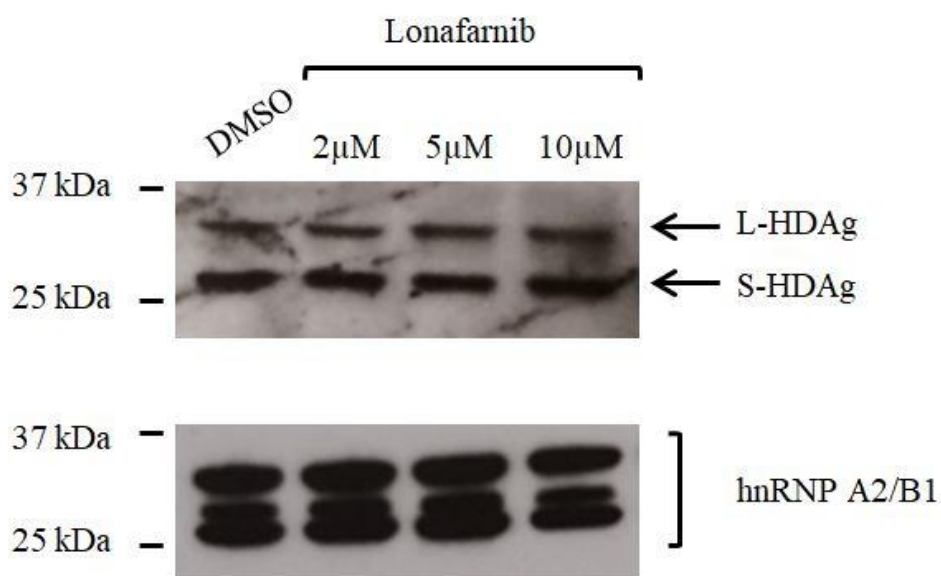


Figura 3.6.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos antígenos do HDV. Células Huh7D12 foram incubadas com concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (2µM, 5µM e 10µM). Os extratos de proteínas colhidos foram corridos em géis SDS-PAGE e os níveis de expressão dos antígenos HDV foram analisados por Western Blot. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO. As bandas seguintes de cada painel correspondem a concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (2µM, 5µM e 10µM). No painel superior, detectamos duas bandas específicas de aproximadamente 27 kDa e 24 kDa que correspondem à isoforma L-HDAg e S-HDAg, respetivamente. No painel inferior, detectamos as bandas específicas correspondentes à proteína hnRNP A2/B1.

No painel superior da figura 3.6, detectamos duas bandas específicas de aproximadamente 27 kDa e 24 kDa que correspondem à isoforma grande do antígeno delta e à isoforma pequena do antígeno, respectivamente. Contrariamente ao observado em relação ao RNA genômico do HDV, a incubação de células Huh7D12 com quantidades crescentes de Lonafarnib não conduziu a alterações nos níveis de expressão dos antígenos delta. Os resultados do Western Blot com o anticorpo específico para a proteína hnRNP A2/B1 mostram níveis idênticos da mesma em todas as amostras analisadas (figura 3.6, painel inferior).

As células Huh7D12 utilizadas nas experiências descritas nos parágrafos anteriores expressam ambos os antígenos delta em simultâneo. Nestas condições verificámos que o Lonafarnib não induz alterações nos níveis de expressão dos antígenos delta, mas uma possibilidade seria que provocasse alterações quando estes fossem expressos de forma isolada. Para tal, células Huh7 foram transitoriamente transfetadas com plasmídeos pSVL-SHDAg e pSVL-LHDAg que codificam para cada um dos antígenos. Após transfeção com 1 micrograma do respetivo plasmídeo e incubação durante 24h, extraímos as proteínas totais e fizemos um Western Blot utilizando anticorpos anti-HDAg (B3) (figura 3.7).

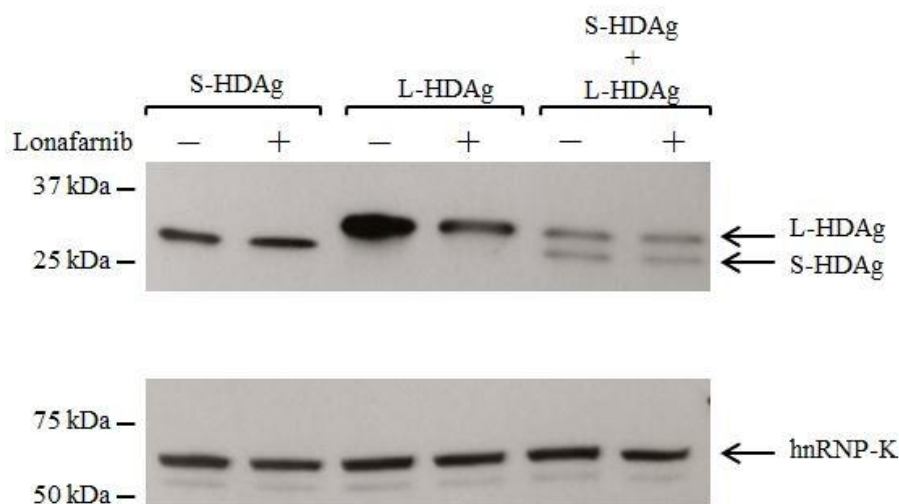


Figura 3.7.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos antígenos do HDV quando expressos de forma isolada. Células Huh7 foram transitoriamente transfetadas com plasmídeos pSVL-SHDAg e pSVL-LHDAg que codificam para cada um dos antígenos. As células Huh7 transfetadas com o respetivo plasmídeo, foram incubadas com uma concentração de 10µM de Lonafarnib. Os extratos de proteína colhidos foram corridos em géis SDS-PAGE e os níveis de expressão dos antígenos HDV foram analisados por Western Blot. No painel superior, detectamos as bandas específicas de aproximadamente 27 kDa e 24 kDa que correspondem à isoforma L-HDAg e S-HDAg, respectivamente. No painel inferior, detectamos a banda específica correspondente à proteína hnRNP-K.

Os resultados descritos no painel superior da figura 3.7 mostram que o Lonafarnib não interfere nos níveis de expressão do antígeno S-HDAg. Pelo contrário, observamos uma diminuição significativa dos níveis do antígeno L-HDAg quando expresso isoladamente. Curiosamente, em células Huh7 co-transfetadas com ambos os plasmídeos e incubadas com Lonafarnib, verificamos que a expressão de ambos os antígenos não é afetada, um resultado em tudo idêntico ao observado na análise dos efeitos do Lonafarnib nas células Huh7D12.

3.4. Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão do oncogene STAT3

Diversos estudos demonstraram que a infecção por HDV é responsável pelo desenvolvimento de cirrose hepática e pela progressão precoce para estádios mais avançados de carcinoma hepatocelular. Um estudo recente em particular demonstrou que o L-HDAg apresenta capacidade de ativar vários promotores heterólogos e elementos ativadores. Um destes elementos é o STAT3, um fator de transcrição que por sua vez regula vários genes específicos envolvidos na transformação oncogénica, sendo que entre eles se encontra o CCND1, um fator de progressão do ciclo celular (Park *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2012).

De modo a analisar se a prenilação do L-HDAg seria importante na regulação da expressão do fator STAT3, e consequentemente no fator CCND1, células Huh7D12 foram colocadas em placas de cultura incubadas com Lonafarnib a uma concentração de 5 μ M e 10 μ M durante 48h. Após este período, extraímos o RNA total, sintetizamos o cDNA e avaliamos os níveis de expressão dos transcritos de STAT3 e CCND1 através da técnica de PCR utilizando pares de *primers* específicos para regiões constitutivas de ambos os fatores. Os resultados mostram que, comparativamente ao controlo DMSO, a incubação das células Huh7D12 com o Lonafarnib conduz a um aumento dos níveis de expressão do transcrito de STAT3 e CCND1 (figura 3.8, painel esquerdo). O mesmo tipo de ensaio foi efetuado para analisar os níveis das proteínas STAT3 e CCND1 incubando os extratos de proteínas totais de células Huh7D12 tratadas com Lonafarnib com anticorpos específicos para estes fatores. Concordante com o resultado obtido na análise transcricional, no painel direito da figura 3.8 podemos observar um aumento dos níveis das proteínas STAT3 e CCND1 concomitante com o aumento da concentração de

Lonafarnib, aumento esse que parece ser específico tendo em conta que os níveis da proteína hnRNP A2/B1 se mantém inalterados.

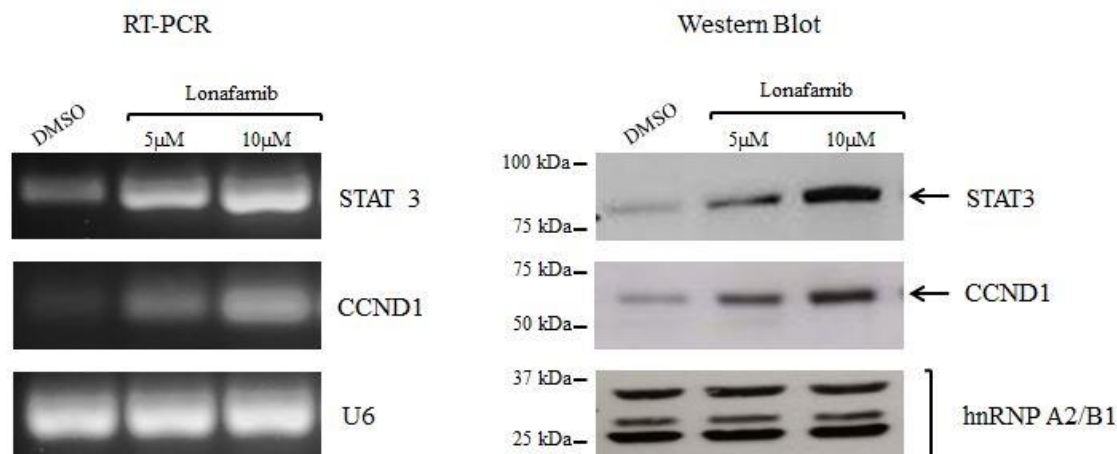


Figura 3.8.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos fatores STAT3 e CCND1 em células Huh7D12. No painel apresentado à esquerda encontram-se os níveis de expressão de STAT3 e CCND1 que foram analisados por PCR e corridos em géis de agarose de 2%. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO. As bandas seguintes de cada painel correspondem a concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (5µM e 10µM).

No painel da direita, células Huh7D12 foram incubadas com concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (5µM e 10µM). Os extratos de proteína colhidos foram corridos em géis SDS-PAGE e os níveis de expressão do STAT3 e CCND1 foram analisados por Western Blot. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO, as bandas seguintes de cada painel correspondem a incubações com Lonafarnib (5µM e 10µM). Na primeira imagem, detectamos uma banda específica de aproximadamente 90 kDa que corresponde a STAT3. Na segunda imagem, detectamos uma banda específica de aproximadamente 60 kDa que corresponde a CCND1. Finalmente, na terceira imagem, detectamos as bandas específicas correspondentes à proteína hnRNP A2/B1.

Para excluir a possibilidade dos aumentos de STAT3 e CCND1 serem devidos a efeitos inespecíficos do Lonafarnib, e desta forma assegurar que a expressão dos componentes do HDV tem influência direta nestes incrementos, decidimos executar o mesmo tipo de ensaios utilizando apenas células Huh7 incubadas com concentrações crescentes do inibidor. Dos resultados cumulativos da figura 3.9 podemos concluir que os níveis de STAT3 e CCND1, analisados quer por RT-PCR quer por Western Blot, não sofrem alterações quando células Huh7 são expostas a concentrações crescentes de Lonafarnib.

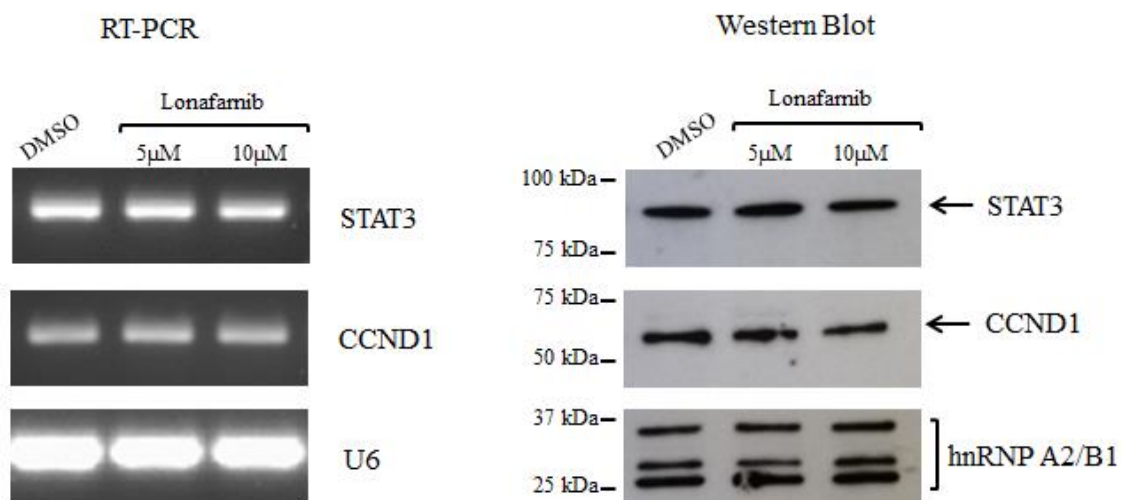


Figura 3.9.: Influência do Lonafarnib nos níveis de expressão dos fatores STAT3 e CCND1 em

células Huh7. No painel apresentado à esquerda encontram-se os níveis de expressão de STAT3 e CCND1 que foram analisados por PCR e corridos em géis de agarose de 2%. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO. As bandas seguintes de cada painel correspondem a concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (5µM e 10µM).

No painel da direita, células Huh7 foram incubadas com concentrações crescentes do inibidor de farnesil-transferases Lonafarnib (5µM e 10µM). Os extratos de proteína colhidos foram corridos em géis SDS-PAGE e os níveis de expressão do STAT3 e CCND1 foram analisados por Western Blot. A primeira banda de cada painel corresponde aos controlos DMSO, as bandas seguintes de cada painel correspondem a incubações com Lonafarnib (5µM e 10µM). Na primeira imagem, detectamos uma banda específica de aproximadamente 90 kDa que corresponde a STAT3. Na segunda imagem, detectamos uma banda específica de aproximadamente 60 kDa que corresponde a CCND1. Finalmente, na terceira imagem, detectamos as bandas específicas correspondentes à proteína hnRNP A2/B1.

4. Discussão e Conclusões

O vírus da hepatite delta foi descrito pela primeira vez em 1977 por Mário Rizzetto e seus colaboradores (Rizzetto *et al.*, 1977) e continua nos dias de hoje a representar um problema de saúde pública mundial. O HDV é o mais pequeno vírus de RNA humano conhecido e, como o seu ciclo infeccioso é dependente dos HBsAg, diz-se ser um vírus satélite do vírus da hepatite B. A forma mais severa de hepatite viral resulta da co-infecção com HBV/HDV que não só aumenta o risco de doença hepática como proporciona um desencadear precoce de hepatocarcinoma, classificado como o quinto cancro mais comum em todo o mundo e uma das complicações com maior gravidade derivada da hepatite viral (Fattovich *et al.*, 2000). Os dados estatísticos mais recentes obtidos pela OMS indicam que, em todo o mundo, aproximadamente 400 milhões de pessoas estejam infetadas cronicamente com HBV (OMS, 2018), das quais, estima-se que 5% estão cronicamente infetadas com HDV. Este último número provavelmente encontra-se bastante sub-representado visto que existem locais endémicos para HBV onde o estudo de HDV é praticamente inexistente (Farci, 2003). Um bom exemplo desta sub-representação é um estudo recente que visou determinar a diversidade e a prevalência da infeção HDV em regiões da África sub-sahariana, concretamente nos Camarões. De um total de 2000 indivíduos infetados com HBV, efetuou-se uma caracterização molecular e serológica destes pacientes, e os autores demonstraram que cerca de 45% dos indivíduos apresentavam co-infecção com HDV (Butler *et al.*, 2018).

Atualmente, não existe terapia específica e eficaz para infeções crónicas de HBV/HDV e as opções terapêuticas existentes são escassas. A vacinação para o HBV actualmente implementada, apesar de ser muito eficaz na prevenção desta infeção, não apresenta os mesmos efeitos em pacientes positivos para HBsAg infetados com HDV (Heidrich *et al.*, 2013). A única terapêutica que mostrou ter algum sucesso quanto à sua atividade antiviral específica contra o HDV é o PEG-IFN. A pegilação, processo de adição do PEG ao IFN, foi desenvolvido em 1978 por Davis e colaboradores com a finalidade de melhorar a entrega de moléculas terapêuticas. Os investigadores observaram que o tempo de circulação das moléculas aumentava após a associação ao PEG (F.F. Davis, 1978). O aumento do tempo de circulação é um dos fatores principais responsável pelo aumento na eficácia do PEG-IFN face ao IFN não associado. A redução da digestão enzimática do IFN é reduzida pela proteção que o PEG confere ao

IFN, limitando a sua filtração por parte dos rins devido ao tamanho aumentado da molécula (Harris *et al.*, 2001). Ainda assim, no contexto da infecção HDV, a eficácia de PEG-IFN é limitada e apenas 15%-40% dos pacientes apresentam redução dos títulos virais no soro. Para além disso, a necessidade de administrações prolongadas tem como consequência um conjunto extenso de efeitos adversos severos que incluem fadiga extrema, mialgias, perda de peso e distúrbios psiquiátricos (Niro *et al.*, 2006; Heller *et al.*, 2014). Para além do interferão, fármacos antivirais usados em regime de monoterapia ou em combinação com o IFN- α , nomeadamente a lamivudina, farnsiclovir e adefovir, foram testados no tratamento de HDV com resultados nada satisfatórios (Yurdaydin *et al.*, 2008; Triantos *et al.*, 2012). Na globalidade, verificou-se que os fármacos conhecidos que têm efeito inibidor no HBV exercem pouco ou nenhum efeito sobre o HDV. Até hoje, o único tratamento possível em casos extremos de cirrose provocada por HDV é o transplante hepático. Apesar do transplante de fígado ser o segundo tipo de transplante de órgão sólido mais comum nos países ocidentais, é um processo moroso, oneroso, com múltiplas complicações e com várias contraindicações como, por exemplo, elevada pressão intracraniana, hipertensão pulmonar grave, necrose hepática fulminante e carcinoma hepatocelular avançado ou metastático (Ichai P. Samuel D., 2019). Por tudo o acima descrito, a busca de terapias inovadoras, drogas específicas, novos alvos moleculares e novas estratégias de tratamento são por isso um desafio de extrema importância em saúde pública global.

Da interação entre os HBsAg e o L-HDAg resulta o empacotamento das partículas virais do HDV, permitindo ao vírus infetar hepatócitos adjacentes e propagar a infecção. Não obstante a quantidade significativa de estudos que visam entender a forma como estes dois componentes interagem, este mecanismo não se encontra totalmente esclarecido. Sabe-se no entanto que as modificações pós-traducionais do L-HDAg desempenham uma função relevante neste processo. Em particular, a prenilação da cisteína 211 localizada nos quatro últimos aminoácidos da extremidade carboxílica do antígeno assume um papel de extrema importância. Esta modificação, catalisada por farnesil-transferases celulares, modifica o resíduo de cisteína pela adição covalente de um lípido prenil, tornando o L-HDAg mais lipofílico e facilitando desta forma a interação com os antígenos de superfície do HBV (Lee *et al.*, 1995). Uma terapia antiviral baseada na inibição das farnesil-transferases celulares pode assim constituir

uma nova abordagem terapêutica no tratamento da hepatite delta crónica, um tipo de abordagem que difere das terapêuticas clássicas na medida em que o alvo do tratamento consiste numa enzima celular e não num componente viral.

De todos os FTI recentemente desenvolvidos, aquele que apresenta maior potencial é o Lonafarnib. Um estudo recente demonstrou que o Lonafarnib reduz significativamente os níveis virais serológicos quando utilizado como tratamento em doentes com infeção HDV crónica (Koh *et al.*, 2015).

Neste trabalho, propusemo-nos a analisar a eficácia e a especificidade deste inibidor no controlo das infeções de HDV. Começamos por avaliar o impacto do Lonafarnib em termos de viabilidade celular numa linha de células humanas Huh7D12 que expressa todos os componentes associados ao ciclo de vida do HDV. Os resultados obtidos no ensaio de viabilidade demonstram que quando os quatro inibidores são utilizados a uma concentração de 2 μ M, o único composto que apresenta alguma citotoxicidade é o FTI-277. Para concentrações superiores verificamos que o Lonafarnib apresenta uma menor citotoxicidade que ambos os compostos A e B, sendo que apenas a concentrações de 20 μ M é que o Lonafarnib começa a apresentar efeitos negativos na viabilidade das células Huh7D12. Do ponto de vista terapêutico é sempre importante definir a gama de concentrações a que um fármaco pode ser utilizado para que se minimizem eventuais efeitos secundários e para que se determinem as concentrações ótimas para obtenção de uma resposta farmacológica máxima.

Sabendo que a uma concentração de 2 μ M os compostos A, B e Lonafarnib não interferiam com a viabilidade celular, fomos analisar o efeito destes compostos na regulação da expressão do RNA genómico do HDV. Trabalhos prévios realizados no nosso laboratório tinham já demonstrado que os compostos A e B tinham a capacidade de promover o aumento da expressão do RNA viral. Os nossos resultados aqui descritos demonstram que o Lonafarnib também conduz ao aumento da expressão do RNA genómico, efeito este que é bastante mais evidente quando comparado com os compostos derivados do FTI-277. Para além disso, e tirando partido do facto das células Huh7D12 tolerarem concentrações superiores a 2 μ M deste inibidor, mostrámos também que existe uma correlação positiva entre o aumento da expressão do RNA genómico e a concentração de Lonafarnib usada nestes ensaios. Tal como referido anteriormente, o Lonafarnib tem a capacidade de inibir a atividade de farnesil-transferases celulares e

desta forma interferir com a modificação pós-traducional da cisteína 211 do L-HDAg, não afetando a forma pequena do antígeno delta. Para além de estar envolvida na interação com os antígenos de superfície do HBV e na montagem dos viriões de HDV, a prenilação do L-HDAg estimula a sua capacidade inibitória da atividade replicativa do S-HDAg. Ao interferirmos farmacologicamente com a prenilação do L-HDAg, a atividade do S-HDAg não é suprimida, explicando o aumento dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV quando as células Huh7D12 são tratadas com Lonafarnib. Os estudos de Koh e colaboradores reportaram uma redução dos níveis virais serológicos quando o Lonafarnib foi utilizado como terapêutica em doentes com infeção HDV crónica. Curiosamente, quando o tratamento destes doentes foi interrompido, todos os indivíduos exibiram um aumento da carga viral no soro e mais de 30% exibiu picos de virémia superiores aos valores que apresentavam antes de iniciar a terapia (Koh *et al.*, 2015). Neste contexto, seria interessante analisar se os níveis de expressão do RNA viral intracelulares dos indivíduos sujeitos a este tipo de tratamento também estariam aumentados. Este aumento, e sua acumulação no interior da célula hepática infetada, poderia justificar a posterior ocorrência de picos superiores de virémia após cessação do tratamento.

Modificações pós-traducionais de proteínas são modificações químicas que os polipéptidos sofrem após a sua tradução. Algumas dessas modificações são essenciais para o desempenho das suas funções normais, influenciando a sua localização intracelular, estabilidade, parceiros com que interagem, complexos em que participem, entre outras. Um dos tipos de modificação pós-traducional é a prenilação, uma modificação que envolve a transferência de um grupo farnesil ou umgeranil-geranil para a extremidade carboxílica de proteínas alvo, com estimativas recentes a indicar que cerca de 5% do proteoma humano é modificado pós-traducionalmente por este tipo de modificação. Existem vários tipos de prenilação e um deles, no qual um grupo isoprenil é adicionado a um resíduo de cisteína, é designado de farnesilação sendo um processo particularmente relevante no mediar de interações proteína-proteína, proteína-membrana e estabilidade proteica (Palsuledesai e Distefano, 2015).

Uma hipótese atrativa seria que a inibição da farnesilação do L-HDAg pela utilização de Lonafarnib afetasse a sua estabilidade levando a uma diminuição dos seus níveis. Neste cenário, e tendo em conta o papel do S-HDAg na ativação da replicação

viral, o antigénio pequeno do HDV assumiria um papel mais preponderante e justificaria o aumento dos níveis do RNA genómico do HDV observados por nós. Através da análise dos extratos proteicos totais das células Huh7D12, observamos que a incubação com Lonafarnib não interfere com a estabilidade do L-HDAg quando ambos os antigénios são expressos em simultâneo. O mesmo resultado foi observado em células Huh7 co-transfetadas com plasmídeos codificantes para ambos os antigénios do HDV. Ainda assim, quando células Huh7 foram transfetadas com um plasmídeo codificante apenas para o L-HDAg, verificamos uma redução dos níveis desta proteína após incubação com o Lonafarnib, um efeito que parece ser específico dado que um conjunto de proteínas por nós analisadas, incluindo o S-HDAg expresso isoladamente, não foram afetadas. Em conjunto, estes resultados sugerem que a farnesilação da cisteína 211 do L-HDAg pode ser importante para a estabilidade da proteína mas que, quando ambos os antigénios são expressos em simultâneo, a ausência desta modificação não resulta num decréscimo dos níveis do L-HDAg, provavelmente devido ao facto de ambos os antigénios interagirem e essa interação poder impedir a degradação do L-HDAg não modificado. No futuro, seria interessante confirmar a menor estabilidade do antigénio grande quando expresso isoladamente, que poderia ser analisada por experiências utilizando inibidores do proteossoma e deteção de formas poliubiquitinadas do L-HDAg não modificado.

Os mecanismos através dos quais o vírus da hepatite delta acelera a progressão da doença hepática não são completamente conhecidos. Várias abordagens têm sido efetuadas numa tentativa de identificar alterações da expressão génica induzidas pela infeção do HDV, incluindo *microarrays* e sequenciação de RNA de linhas celulares a expressar componentes do HDV e mesmo culturas primárias de hepatócitos humanos infetados com viriões de HDV. Alguns estudos sugerem que o HDV consegue induzir um conjunto de alterações epigenéticas, pelo aumento da expressão de DNMT3b (DNA metiltransferase 3b), promovendo hipermetilação do promotor do gene E2F1 e consequente diminuição da sua expressão, que por sua vez influencia a expressão de vários genes envolvidos no controlo do ciclo celular (Benegiamo *et al.*, 2013). Outros estudos indicam a existência de alterações na expressão génica de vários membros da via de sinalização JAK-STAT após infeção por HDV, que curiosamente parecem estar relacionadas com resistência a terapias baseadas em IFN- α (Pugnale *et al.*, 2009). De

todos os membros da família STAT, o gene STAT3 é particularmente interessante dada a ligação bem documentada entre o aumento da sua expressão e o desenvolvimento de HCC (Feng *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2010). STAT3 é um dos membros de uma vasta família de fatores de transcrição que são ativados por tirosinas cinases. Uma vez fosforilada, a proteína STAT3 dimeriza, transloca-se para o núcleo celular e participa na transcrição de vários genes com funções diversas tais como diferenciação, proliferação e apoptose (Brantley and Benveniste, 2008).

Concretamente em relação à influência de HDV sobre o fator de transcrição STAT3, o vírus não parece atuar diretamente. Um estudo recente mostrou que a expressão transitória do L-HDAg do HDV conduz a um aumento da expressão de STAT3 através de um mecanismo que envolve a produção de ROS (Williams *et al.*, 2012). Neste último estudo, os autores também demonstraram que uma versão mutante do L-HDAg, onde a cisteína 211 foi substituída por uma serina, também induz um aumento da expressão de STAT3 mas inferior aquele que ocorre quando a versão *wild-type* do L-HDAg é expressa. Isto parece sugerir que interferir com a farnesilação do L-HDAg permitiria modular a expressão deste oncogene. Ao contrário do que seria expectável, os nossos resultados mostram um aumento da expressão de STAT3, e de um gene regulado por STAT3 como CCND1, quando incubamos células Huh7D12 com concentrações crescentes de Lonafarnib. Este aumento, observado por nós quer em termos de expressão de RNA quer em termos de proteína, parece ser dependente da presença dos componentes do HDV pois o mesmo não se verifica quando as mesmas experiências foram efetuadas com uma linha celular que não expressa HDV. Uma possibilidade seria que o L-HDAg não farnesilado promova o aumento da expressão do STAT3, o que está de acordo com alguns estudos previamente publicados e que poderia ser testado por nós através da medição da quantidade de espécies reativas de oxigénio ou pela expressão transitória de formas mutantes do L-HDAg sem a cisteína 211. Mas uma outra possibilidade atrativa é que este aumento de STAT3 seja devido à acumulação intracelular do RNA genómico do HDV que ocorre quando quantidades crescentes de Lonafarnib são utilizadas. Isto poderia ser testado experimentalmente pela análise dos níveis de STAT3 e de CCND1 em células Huh7 transfetadas transitoriamente com vectores como o pDL542 e pDL481, versões mutantes do plasmídeo pSVLD3 mas que apenas conduzem à expressão do RNA genómico e do RNA antigenómico do HDV

respetivamente (Tavanez *et al.*, 2002). O RNA genómico do HDV poderia ser encarado como um transcrito tóxico, cuja acumulação poderia estar na base do desenvolvimento de mecanismos patogénicos através, por exemplo, do sequestro de proteínas de ligação a RNA, uma situação que tem sido observada em várias doenças RNA dominantes como a Distrofia Miotónica, Esclerose Lateral Amiotrófica, Demência Frontotemporal e outras doenças degenerativas (Udd B e Krahe, 2012; Belzil *et al.*, 2013). Os resultados dos ensaios clínicos onde o Lonafarnib foi utilizado são extremamente convincentes no que concerne à redução dos níveis de partículas virais de HDV no soro de doentes cronicamente infetados mas omissos na análise do que acontece no interior do hepatócito infetado. Urge averiguar se doentes tratados com Lonafarnib também apresentam acumulação nuclear do RNA genómico do HDV pois um efeito secundário deste tipo pode ser responsável por alterações de expressão génica, como as alterações em STAT3 e CCND1 por nós descritas por exemplo, que interfiram de forma negativa na homeostase dos indivíduos.

5. Referências Bibliográficas

- Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kB: The enemy within. *Cancer cell*, Sep;6(3):203-8.
- Alves, C., Branco, C., Cunha, C. Hepatitis Delta Virus: a peculiar virus. *Advances in Virology*, 2013:560105.
- Alves, R., Alves, D., Gruz, B., Matos, C., Viana, M., Harriz, M., Terrabuio, D., Kondo, M., Gampel, O., Polletti, P. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Annals of Hepatology*, 2011 Jan-Mar;10(1):21-7.
- Aslam, H., Qadeer, R., Kashif, M., Rehan, M., Afsar, S. Unique side effects of interferon. *Journal of Pakistan Medical Association*, 2015 Aug;65(8):895-7.
- Belzil VV, Gendron TF, Petrucelli L. RNA-mediated toxicity in neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Sep;56:406-19.
- Benegiamo, G., Vinciguerra, M., Guarnieri, V., Niro, G.A., Andriulli, A., Paziienza, V. Hepatitis delta virus induces specific DNA methylation processes in Huh-7 liver cancer cells. *FEBS Letters*, 2013 May 2;587(9):1424-8.
- Bordier, B.B., Marion, P.L., Ohashi, K., Kay, M.A., Greenberg, H.B., Casey, J.L., Glenn, J.S. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *Journal of Virology*, 2002 Oct;76(20):10465-72.
- Bordier, B.B., Ohkanda, J., Liu, P., Lee, S.Y., Salazar, F.H., Marion, P.L., Ohashi, K., Meuse, L., Kay, M.A., Casey, J.L., Sebti, S.M., Hamilton, A.D., Glenn, J.S. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *Journal of Clinical Investigation*, 2003 Aug;112(3):407-14.
- Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos AO, Salcedo JMV, Vieira DS. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol J*. 2017 Sep 13;14(1):177.
- Brantley, E., Benveniste, E. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Molecular Cancer Research*, 2008 May;6(5):675-84.
- Butler EK, Rodgers MA, Collier KE, Barnaby D, Krilich E, Olivo A, Cassidy M, Mbanya D, Kaptue L, Ndembu N, Cloherty G. High prevalence of hepatitis delta virus in Cameroon. *Sci Rep*. 2018 Aug 2;8(1):11617.
- Carloni, V., Vizzutti, F., Pantaleo, P. Farnesyltransferase inhibitor, ABT-100, is a potent liver cancer chemopreventive agent. *Clinical Cancer Research*, 2005 Jun 1;11(11):4266-74.
- Chang, J., Nie, X., Chang, H.E., Han, Z., Taylor, J. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *Journal of Virology*, 2008 Feb;82(3):1118-27.
- Chang, M.F., Baker, S.C., Soe, L.H., Kamahora, T., Keck, J.G., Makino, S., Govindarajan, S., Lai, M.M.C. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA binding activity. *Journal of Virology*, 1988 Jul;62(7):2403-10.

- Chao, W., Deng, J., Li, P., Liang, Y., Huang, G. 3,4-Dihydroxybenzalactone suppresses human non-small cell lung carcinoma cells metastasis via suppression of epithelial to mesenchymal transition, ROS-mediated PI3K/AKT/MAPK/MMP and NFkB signaling pathways. *Molecules*, 2017 Mar 28;22(4).
- Chen, C.W., Tsay, Y.G., Wu, H.L., Lee, C.H., Chen, D.S., Chen, P.J. The double-stranded RNA-activated kinase, PKR, can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 2002 Sep 6;277(36):33058-67.
- Chen, P.J., Kalpana, G., Goldberg, J., Mason, W., Werner, B., Gerin, J., Taylor, J. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1986 Nov;83(22):8774-8.
- Chen, Y., Huang, W., Hong, S., Tsay, Y., Chen, P. ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication. *Journal of Virology*, 2008 Oct;82(19):9345-58.
- Chou, H.C., Hsieh, T.Y., Sheu, G.T., Lai, M.M. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *Journal of Virology*, 1998 May;72(5):3684-90.
- Cunha C, Tavanez JP, Gudima S. Hepatitis delta virus: A fascinating and neglected pathogen. *World J Virol*. 2015 Nov 12;4(4):313-22.
- Cunha, C., Monjardino, J., Chang, D., Krause, S., Carmo-Fonseca, M. Location of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells. *RNA*, 1998 Jun;4(6):680-93.
- Davis FC, Davis RW. Polyadenylation of RNA in immature oocytes and early cleavage of *Urechis caupo*. *Dev Biol*. 1978 Sep;66(1):86-96.
- Farci, P. Delta hepatitis: an update. *Journal of Hepatology*, 2003;39 Suppl 1:S212-9.
- Farci, P. Treatment of chronic hepatitis D: New advances, old challenges. *Hepatology*, 2006 Sep;44(3):536-9.
- Farci, P., Mandas, A., Coiana, A., Lai, M.E., Desmet, V., Eyken, P.V., Gibo, Y., Caruso, L., Scaccabarozzi, S., Criscuolo, D., Ryff, G.C., Balestrieri, A. Treatment of Chronic Hepatitis D with Interferon Alfa-2a. *The New England Journal of Medicine*, 1994 Jan 13;330(2):88-94.
- Farci, P., Niro, G. Clinical features of hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*, 2012 Aug;32(3):228-36.
- Farci, P., Roskams, T., Chessa, L., Peddis, G., Mazzoleni, A.P., Scioscia, R., Serra, G., Lai, M.E., Loy, M., Caruso, L., Desmet, V., Purcell, R.H., Balestrieri, A. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 2004 Jun;126(7):1740-9.
- Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zigni, I., Realdi, G., Schalm, S. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*, 2000 Mar;46(3):420-6.

- Feng DY, Zheng H, Jiang HY. Effects of STAT3 phosphorylation and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2001 Feb 28;26(1):17-9.
- Fiedler, M., Roggendorf, M. Immunology of HDV infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006;307:187-209.
- Flores, R., Owens, R.A., Taylor, J. Pathogenesis by subviral agents: viroids and hepatitis delta virus. *Current Opinion in Virology*, 2016 Apr;17:87-94.
- Freitas, N., Salisse, J., Cunha, C., Toshkov, I., Menne, S., Gudima, S.O. Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks. *Hepatology*, 2012 Jul;56(1):76-85.
- Fu, T.B., Taylor, J. The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *Journal of Virology*, 1993 Dec;67(12):6965-72.
- Gerin, J.L., Suzuki, H., Mishiro, S., Oda, T. The taxonomy of hepatitis delta virus. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, 63-64. Tokyo: Springer, 1994.
- Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberger DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, Fligor B, Bishop WR, Statkevich P, Regen A, Sonis A, Riley S, Ploski C, Correia A, Quinn N, Ullrich NJ, Nazarian A, Liang MG, Huh SY, Schwartzman A, Kieran MW. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 9;109(41):16666-71.
- Gordon LB, Massaro J, D'Agostino RB Sr, Campbell SE, Brazier J, Brown WT, Kleinman ME, Kieran MW; Progeria Clinical Trials Collaborative. Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation*. 2014 Jul 1;130(1):27-34.
- Greco-Stewart, V., Pelchat, M. Interaction of Host Cellular Proteins with Components of the Hepatitis Delta Virus. *Viruses*, 2010 Jan;2(1):189-212.
- Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(7):539-51.
- He, L.F., Ford, E., Purcell, P.H., London, W.T., Phillips, J., Gerin, J.L. The size of the hepatitis delta agent. *Journal of medical virology*, 1989 Jan;27(1):31-3.
- Heidrich B, Manns MP, Wedemeyer H. Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2013 Feb;15(1):31-8.
- Heidrich, B., Deterding, K., Tillmann, H.L., Raupach, R., Manns, M.P., Wedemeyer, H. Virological and clinical characteristics of delta hepatitis in Central Europe. *Journal of Viral Hepatology*, 2009 Dec;16(12):883-94.
- Heller, T., Rotman, Y., Koh, C., Clark, S., Haynes-Williams, V., McBurney, R., Schmid, P., Albrecht, J., Kleiner, D., Ghany, M., Liang, T., Hoofnagle, J. Long term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2014 Jul;40(1):93-104..

- Hourioux, C., Sureau, C., Poisson, F., Brand, D., Goudeau, A., Roingard, P. Interaction between hepatitis delta virus-encoded proteins and hepatitis B virus envelope protein domains. *Journal of General Virology*, 1998 May;79 (Pt 5):1115-9.
- Hsieh, S.Y., Chao, M., Coates, L., Taylor, J. Hepatitis delta. genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *Journal of Virology*, 1990 Jul;64(7):3192-8.
- Hsieh, S.Y., Taylor, J. Regulation of polyadenylation of hepatitis delta virus antigenomic RNA. *Journal of Virology*, 1991 Dec;65(12):6438-46.
- Hsieh, S.Y., Yang, P.Y., Ou, J.T., Chu, C.M., Liaw, Y.F. Polyadenylation of the mRNA of hepatitis delta virus is dependent on the structure of the nascent RNA and regulated by the small or large delta antigen. *Nucleic Acids Research*, 2006 Nov;105(11):869-81.
- Hsieh, T.H., Liu, C.J., Chen, D.S., Chen, P.J. Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2006 Nov;105(11):869-81.
- Huang, W.H., Chen, Y.S., Chen, P.J. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *Journal of Virology*, 2008 Jan;82(2):692-9.
- Hughes, S.A., Wedemeyer, H., Harrison, P. Hepatitis delta virus. *The Lancet*, 2011 Jul 2;378(9785):73-85.
- Huo, T.I., Wu, J.C., Wu, S.I., Chang, A.L., Lin, S.K., Pan, C.H., Huang, Y.H., Chang, F.Y., Lee, S.D. Changing seroepidemiology of hepatitis B, C and D virus infections in high-risk populations. *Journal of Medical Virology*, 2004 Jan;72(1):41-5.
- Ichai P, Samuel D. Management of Fulminant Hepatitis B. *Curr Infect Dis Rep*. 2019 Jun 4;21(7):25.
- Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, Winters MA, Subramanya G, Cooper SL, Pinto P, Wolff EF, Bishop R, Ai Thanda Han M, Cotler SJ, Kleiner DE, Keskin O, Idilman R, Yurdaydin C, Glenn JS, Heller T. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis*. 2015 Oct;15(10):1167-1174.
- Koh C, Heller T, Glenn JS. Pathogenesis of and New Therapies for Hepatitis D. *Gastroenterology*. 2019 Jan;156(2):461-476.e1.
- Kubben N, Misteli T. Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Oct;18(10):595-609.
- Kuo, M.Y.P., Goldenberg, J., Coates, L., Mason, W., Gerin, J., Taylor, J. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure and applications. *Journal of Virology*, 1988 Jun;62(6):1855-61.

- Lazinski, D.W., Taylor, J.M. Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: Regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *Journal of Virology*, 1995 Feb;69(2):1190-200.
- Lee, C.H., Chang, S.C., Wu, C.H., Chang, M.F. 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*, 2001 Mar 16;276(11):8142-8.
- Lee, C.Z., Chen, P.J., Lai, M.M., Chen, D.S. Isoprenylation of the large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology*, 1994 Feb 15;199(1):169-75.
- Lee, C.Z., Lin, J.H., Chao, M., McKnight, K., Lai, M.M. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of Virology*, 1993 Apr;67(4):2221-7.
- Li, Y.J., Macnaughton, T., Gao, L., Lai, M.M. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *Journal of Virology*, 2006 Jul;80(13):6478-86.
- Liu Y, Fuchs J, Li C, Lin J. IL-6, a risk factor for hepatocellular carcinoma: FLLL32 inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation in human hepatocellular cancer cells. *Cell Cycle*. 2010 Sep 1;9(17):3423-7.
- Lozano, J.L., Crespo, J., de la Cruz, F., Casafont, F., Lopez-Arias, M.J., Martín-Ramos, L., Pons-Romero, F. Correlation between hepatitis B viremia and the clinical and histological activity of chronic delta hepatitis. *Medical Microbiology and Immunology*, 1994 Jul;183(3):159-67.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012 Dec 15;380(9859):2095-128.
- Macnaughton, T.B., Wand, Y.J., Lai, M.M. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage. *Journal of Virology*, 1993 Apr;67(4):2228-34.
- Madejón, A., Bartolomé, J., Carreño, V. In vitro inhibition of the hepatitis delta virus replication mediated by interferon and trans-ribozyme or antisense probes. *Journal of Hepatology*, 1998 Sep;29(3):385-93.
- Maltese, W.A. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1990 Dec;4(15):3319-28.
- Manesis, E.K., Vourli, G., Dalekos, G., Vasiliadis, T., Manolaki, N., Hounta, A., Koutsounas, S., Vafiadis, I., Nikolopoulou, G., Giannoulis, G., Germanidis, G., Papatheodoridis, G., Touloumi, G. Prevalence and clinical course of hepatitis delta

- infection in Greece: a 13-year prospective study. *Journal of Hepatology*, 2013 Nov;59(5):949-56.
- Manock, S.R., Kelley, P.M., Hyams, K.C., Douce, R., Smalligan, R.D., Watts, D.M., Sharp, T.W., Casey, J.L., Gerin, J.L., Engle, R., Alava-Alprecht, A., Martínez, C.M., Bravo, N.B., Guevara, A.G., Russell, K.L., Mendoza, W., Vimos, C. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000 Sep-Oct;63(3-4):209-13.
- Modahl, L.E., Lai, M.M.C. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and regulation. *Journal of Virology*, 1998 Jul;72(7):5449-56.
- Modahl, L.E., Macnaughton, T.B., Zhu, N., Johnson, D.L., Lai, M.M.C. RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Molecular and cellular biology*, 2000 Aug;20(16):6030-9.
- Murphy, F.A. B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. Virus taxonomy. *Fields Virology*, 15-57. Philadelphia: Raven Press, 1996.
- Niro, G.A., Rosina, F., Rizzetto, M. Treatment of hepatitis D. *Journal of Viral Hepatology*, 2005 Jan;12(1):2-9.
- Niro, G.A., Smedile, A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Current Infectious Disease Reports*, 2012 Feb;14(1):9-14.
- Palsuledesai, C.C., Distefano, M.D. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. *ACS Chemical Biology*, 2015 Jan 16;10(1):51-62.
- Park, C., Oh, S., Kang, S., Lim, Y., Hwang, S.B. Hepatitis delta virus large antigen sensitizes to TNF-alpha-induced NF-kB signaling. *Molecules and Cells*, 2009 Jul 31;28(1):49-55.
- Pugnale, P., Pazienza, V., Guilloux, K., Negro, F. Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology*, 2009 Feb;49(2):398-406.
- Ramalho, F., Carvalho, G., Bonino, F., Baptista, A., de Moura, M.C. Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1987;234:409-17.
- Rizzetto, M. Hepatitis D: thirty years after. *Journal of Hepatology*, 2009 May;50(5):1043-50.
- Rizzetto, M. The adventure of delta. *Liver International*, 2016 Jan;36 Suppl 1:135-40.
- Rizzetto, M., Canese, M.G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Verme, G. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut*, 1977 Dec;18(12):997-1003.

- Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W., Purcell, R.H., Gerin, J.L. δ Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980 Oct;77(10):6124-8.
- Rizzetto, M., Verme, G., Rechia, S., Bonino, F., Arico, S., Caizia, R., Picciotto, A., Colombo, M., Popper, H. Chronic HBsAg positive hepatitis with intrahepatic expression of delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Annals of Internal Medicine*, 1983 Apr;98(4):437-41.
- Rizzetto M, Urban S, Wedemeyer H; Hepatitis Delta International Network (HDIN). Treating chronic hepatitis delta: The need for surrogate markers of treatment efficacy. *J Hepatol*. 2019 May;70(5):1008-1015.
- Sangiovanni, A., Prati, G., Fasani, P., Ronchi, G., Romeo, R., Manini, M., Ninno, E., Morabito, A., Colombo, M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C: a 17-year cohort study of 214 patients . *Hepatology*, 2006 Jun;43(6):1303-10.
- Sato, S., Wong, S.K., Lazinski, D.W. Hepatitis delta virus minimal substrates competent for editing by ADAR1 and ADAR2 . *Journal of Virology*, 2001 Sep;75(18):8547-55.
- Shen, M., Pan, P., Li, Y., Li, D., Yu, H., Hou, T. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. *Drug Discovery Today*, 2015 Feb;20(2):267-76.
- Sureau, C. Hepatitis delta virus: HDV-HB interactions. In *Hepatitis Delta Virus*, de Handa, H., Yamaguchi, Y., 10-20. Berlin: Springer, 2006.
- Sureau, C., Guerra, B., Lanford, R.E. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *Journal of Virology*, 1993 Jan;67(1):366-72.
- Tavanez, J.P., Cunha, C., Silva, M.C., David, E., Monjardino, J., Carmo-Fonseca, M. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*, 2002 May;8(5):637-46.
- Taylor, J.M. Hepatitis D virus replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015 Nov 2;5(11).
- Taylor, J.M. Hepatitis delta virus and its replication. In *Fields Virology*, de Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 479-483. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1996.
- Taylor, J.M. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World Journal of Gastroenterology*, 2014 Mar 21;20(11):2971-8.
- Taylor, J.M. The structure and replication of hepatitis delta virus. *Annual Reviews of Microbiology*, 1992;46:253-76.
- Torres, J.R. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. *Gut*, 1996;38 Suppl 2:S48-55.

- Triantos, C., Kalafateli, M., Nikolopoulou, V., Burroughs, A. Meta-analysis: antiviral treatment for hepatitis D. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2012 Mar;35(6):663-73.
- Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol*, 2012 Oct;11(10):891-905.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012 Aug;40(15):e115.
- Williams, V., Brichtler, S., Khan, E., Chami, M., Deny, P., Kremsdorf, D., Gordien, E. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *Journal of viral hepatitis*, 2012 Oct;19(10):744-53.
- Wu, J.C. Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006;307:173-86.
- Wu, J.C., Chen, C.M., Sheen, I.J., Lee, S.D., Tzeng, H.M., Choo, K.B. Evidence of transmission of hepatitis Delta virus to spouses from sequence analysis of the viral genome. *Hepatology*, 1995 Dec;22(6):1656-60.
- Yamaguchi, Y., Filipovska, J., Yano, K., Furuya, A., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., Sugimoto, S., Konarska, M.M., Handa, H. Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science*, 2001 Jul 6;293(5527):124-7.
- Yan, H., Liu, Y., Sui, J., Li, W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Research*, 2015 Sep;121:24-30.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., Li, W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 2012 Nov 13;1:e00049.
- Young SG, Yang SH, Davies BS, Jung HJ, Fong LG. Targeting protein prenylation in progeria. *Sci Transl Med*. 2013 Feb 6;5(171):171ps3.
- Yurdaydin, C. Treatment of chronic delta hepatitis. *Seminars in Liver Disease*, 2012 Aug;32(3):237-44.
- Yurdaydin, C., Bozkaya, H., Onder, F.O., Sentürk, H., Karaaslan, H., Akdogan, M., Cetinkaya, H., Erden, E., Erkan-Esin, O., Yalçın, K., Bozdayi, A.M., Schinazi, R.F., Gerin, J.L., Uzunalimoglu, O., Ozden, A. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon. *Journal of Viral Hepatology*, 2008 Apr;15(4):314-21.