

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIANGELA CARNIVALLI GRIPPO

**“Uso da interferência por RNA no vírus da
hepatite murina tipo 3 (MHV-3)”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética Animal
e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes

Co-orientador: Prof. Dr. Rovilson Gilioli

Campinas
2006

UNIDADE - BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
G886u
V _____ EX _____
TOMBO BCI 70318
PROC. 16-13306
C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO \$11
DATA 16/10/2006

BIB ID: 388709

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G886u

Grippe, Mariangela Carnivalli

Uso da interferência por RNA no vírus da hepatite murina tipo 3 (MHV-3) / Mariangela Carnivalli Grippe. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Iscia Lopes-Cendes.

Co-orientador: Rovilson Gilioli.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vírus da hepatite murina. 2. RNAi. 3. Silenciamento gênico. 4. Interferon. 5. Vírus. I. Lopes-Cendes, Iscia. II. Gilioli, Rovilson. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: RNA interference in MHV-3.

Palavras-chave em inglês: Murine hepatitis virus; RNAi; RNA silencing; Interferon; Virus.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Iscia Lopes-Cendes, Maria Sílvia Viccari Gatti, Clarice Weis Ams, Ivan Godoy Maia, Juarez Antonio Simões Quaresma.

Data da defesa: 25/04/2006.

Campinas, 25 de abril de 2006.

Banca Examinadora

Profª. Dra. Iscia Lopes -Cendes(Orientadora)
(Titular)

Assinatura

Prof. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti
(Titular)

Assinatura

Profª. Dra. Clarice Weis Arns
(Titular)

Assinatura

Prof. Dr. Ivan Godoy Maia
(Titular)

Assinatura

Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma
(Titular)

Assinatura

Prof. Dr. Fábio Trindade de Maranhão Costa
(Suplente)

Assinatura

Prof. Dr. Jorge Vega
(Suplente)

Assinatura

Prof. Dr. Rogério Margis
(suplente)

Assinatura

Aos

Meus pais

Geraldo Grippo e Valquiria Carnivalli Grippo

**Pelo apoio, pelo amor e pelos conselhos em etapas tão difíceis e por serem tão especiais
em minha Vida**

A todos que acreditaram e estiveram do meu lado, dedico este trabalho

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.
(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a chance de melhorar a cada dia nesta vida;

À Prof. Iscia Lopes-Cendes pela confiança, paciência e pela orientação deste trabalho,

Ao Prof. Rovilson Gilioli , pelos ensinamentos, apoio, ajuda, sugestões, amizade durante a co-orientação ;

Ao Professor Ivan de Godoy Maia pelos comentários, ajuda nas etapas finais deste trabalho;

À Daniele Masseli Rodrigues Demolin, pela grande amizade, conselhos e apoio em todos os momentos , desde o início da carreira científica;

À todo o pessoal do CEMIB, Silvio Rogério Cardoso dos Santos, Márcia Costa Rocha , Lenira A. G.Andrade , Armando Ferreira Lima Filho pela grande amizade, paciência e ajuda durante o andamento deste trabalho;

À Patrícia Aline de Oliveira Aguiar, pela ajuda nos experimento de REAL-TIME e pela grande amizade nestes dois últimos anos,

À todo o grupo de RNAi do no laboratório de Genética Molecular da FCM , Fábio Conte, Vinícius Pascoal, Mariana Saragiotto, Tiago Campos Pereira, Danyella Dogini pela ajuda em varias etapas do trabalhos, e pela amizade em todos os momentos;

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular, em especial a Fabio Rossi Torres, Miram G.G. Contessotto , Rejane Paiva , pela amizade e apoio em todos os momentos;

À bióloga Dirce Lima Gabriel, pelos ensinamentos transmitidos desde a iniciação científica;

Ao amigo Luís Peroni, pela grandiosa amizade e pela ajuda no *Western blot*;

A todos meus amigos, em especial, Daniela M. Ribeiro, Antonio Carlos Tavoni, Cleber Rodrigues, Luciane Germano da Silva e Alessandra Barboza, pelo carinho e amizade em todos os momentos,

A minha segunda família, em especial para Tereza Kawabata, Sandra Martins, Mariana Bombanati, Kellye R. Machado, Marcelo Rossi e Ubiratan Schenkel pelos conselhos e companheirismo em todos os momentos;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e no Laboratório de Controle de Qualidade Animal do CEMIB-UNICAMP.

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	Microlitro
cDNA	DNA complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CIAP	Fosfatase Alcalina
CO ₂	Gás Carbônico
Ct	<i>Thereshold Cycle</i>
DEPC	Ditilpirocarbonato
dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
dsRNA	RNA dupla-fita
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme- linked immunosorbent assay</i>
ERAF	<i>Erythroid didderentiation-related factor</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Energia livre
GAPD	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Hpi	Horas pós-infecção

Hpt	Horas pós- transfecção
IFN	Interferon
Kb	Kilobase
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHV	<i>Murine Hepatitis Virus</i>
N	Nucleocapsídeo
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeos
OAS	2'5'oligo sintetase
°C	Graus Celsius
ORF	<i>Open read frame</i>
pb	Pares de bases
PKR	Proteína Kinase
RISC	Complexo de RNA indutor de silenciamento
RNA	Ácido ribonucleíco
RNAi	Interferência por RNA
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome

SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyls sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
TAE	Tris-Acetato EDTA
TCID ₅₀	<i>Median tissue culture infection dose</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Via de silenciamento gênico pós-transcricional (RNAi).....	6
Figura 2.	Organização genômica dos coronavírus.....	12
Figura 3.	Morfologia da partícula viral de um Coronavírus.....	13
Figura 4.	Diagrama mostrando o processo de replicação dos Coronavírus.....	16
Figura 5.	Mecanismo de ação de Interferon.....	21
Figura 6.	Síntese de siRNAs através da transcrição <i>in vitro</i> por T7 RNA polimerase.....	28
Figura 7.	Tela do aplicativo “ 7500 System SDS Software” mostrando a curva padrão gerada a partir do log da concentração das amostras e os Cts	38
Figura 8.	Células L-929. Controle negativo (A) . Células L-929 infectadas com 1 TCID ₅₀ do MHV-3. Controle positivo(B).Aumento 250 x.....	42
Figura 9.	Células L929 transfectadas com o siRNA 634 e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpt). Aumento 250x.....	43
Figura 10.	Células L929 transfectadas com o siRNA 910 e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpt). Aumento 250x.....	43
Figura 11.	Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante (<i>S. mansoni</i>) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpt). Aumento 250x.....	43
Figura 12.	Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante ERAF e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	43
Figura 13.	Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante (<i>S. mansoni</i>) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	46
Figura 14.	Células L29 transfectadas com o siRNA irrelevante (<i>S. mansoni</i>)/CIAP e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	46

Figura 15. Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante ERAF e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	46
Figura 16. Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante ERAF/CIAP e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	46
Figura 17. Células L929 transfectadas com o siRNA 634 e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	47
Figura 18. Células L929 transfectadas com o siRNA 634 /CIAP e infectada com 1TCID ₅₀ do MHV-3(24 hpi). Aumento 250x.....	47
Figura 19. Células L929 transfectadas com o siRNA910 e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3(24 hpi). Aumento 250x.....	47
Figura 20. Células L929 transfectadas com o siRNA 910 /CIAP e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	47
Figura 21. Células L929. Células controle. Aumento 250x.....	49
Figura 22. Células L929 infectadas com 1 TCID ₅₀ do MHV- 3. Aumento 250x.....	49
Figura 23. Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante (<i>GFP</i>) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	50
Figura 24. Células L929 transfectadas com o siRNA N e infectada com 1TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	50
Figura 25. Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante (<i>GFP</i>) (162ng) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi).Aumento 250x	50

Figura 26. Células L929 transfectadas com o siRNA N (162ng) e infectada com TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	50
Figura 27. Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante(<i>GFP</i>) (189ng) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3(24 hpi). Aumento 250x	51
Figura 28. Células L929 transfectadas com o siRNA N (189ng) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	51
Figura 29. Células L929 transfectadas com o siRNA GFP(216ng)e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	51
Figura 30. Células L929 transfectadas com o siRNA N (216ng) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	51
Figura 31. CélulasL929 transfectadas com o siRNA GFP (243ng) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x	52
Figura 32. Células L929 transfectadas com o siRNAN (243ng) e infectada com 1TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	52
Figura 33. Células L929 transfectadas com o siRNA irrelevante (<i>GFP</i>) (270ng) e infectada com 1TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	52
Figura 34. Células L929 transfectadas com o siRNA N(270ng) e infectada com 1 TCID ₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x.....	52
Figura 35. Eletroforese em gel de agarose 1% . Produto amplificado de 2 diferentes tamanhos: 402pb (α -tubulina) e 712 pb (Proteína N), obtido do sobrenadante de células L-929.....	54
Figura 36. Curvas padrão utilizadas para o cálculo da eficiência das reações.....	56

Figura 37. Gráfico gerado pelo programa “7500 System SDS Software” mostrando a cinética de amplificação em escala logarítmica do gene da proteína N e do controle endógeno GAPD com diferentes concentrações de cDNA.....	56
Figura 38. Expressão do gene da proteína N em diferentes tratamentos, utilizando como calibrador a amostra transfectada como os siRNA N.As avaliações foram feitas em triplicatas.....	57
Figura 39. Análise da expressão da proteína N por <i>Western blot</i>	58

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interferência por RNA-histórico.....	2
1.2. Mecanismo de Silenciamento-RNAi.....	4
1.3. Aplicações Terapêuticas da RNAi.....	7
1.4. O vírus da Hepatite Murina.....	11
1.5. Fator limitante da Interferência por RNA(RNAi).....	18
1.5.1. Ativação de IFN.....	20

2. OBJETIVOS.....

23

3. MATERIAL E MÉTODOS.....

25

3.1. Desenho dos siRNAs sintetizados por T7RNA polimerase.....	26
3.2. Síntese dos siRNAs sintetizados por T7RNA polimerase	28
3.3. Tratamento com fosfatase alcalina e purificação dos siRNAs.....	29
3.4. Desenho dos siRNAs sintéticos.....	29
3.5. Cultura Celular e Transfecção	31
3.6. Determinação da TCID ₅₀ e infecção da monocamada das células L-929 por MHV-3.....	32
3.7. Definição dos ensaios realizados.....	33
3.8. Extração de RNA	33
3.9. Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa(RT-PCR).....	34
3.10. PCR em tempo real.....	36
3.11. Western blot.....	39

4. RESULTADOS.....

41

4.1. Análise microscópica.....	42
4.1.1. Análise das transfecções com siRNAs transcritos por T7 RNA polimerase por microscopia óptica.....	42
4.1.2. Análise das transfecções realizadas com siRNAs sintéticos por microscopia óptica	49

4.2. Análise Molecular.....	54
4.2.1. RT-PCR.....	54
4.2.2. PCR em Tempo Real.....	55
4.2.3. <i>Western blot</i>	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	66
7. BIBLIOGRAFIA	68
8. ANEXOS	78
8.1 Mariangela C.Grippo, Tiago Campos- Pereira, Vinicius D. Pascoal, Patrícia A. R. Aguiar, Rovilson Gilioli and Iscia Lopes-Cendes. 5' triphosphate of <i>in vitro</i> transcribed small interfering RNA molecules (siRNAs) induce antiviral response. In submission.....	85

RESUMO

A interferência do RNA (RNAi) pode ser usada como uma ferramenta eficaz no silenciamento gênico específico mediado por moléculas de dupla fita de RNA (dsRNAs). Nesse contexto possui uma variedade de aplicações biológicas, incluindo o combate a patógenos infecciosos de importância biomédica. O objetivo do estudo foi determinar a eficiência e a especificidade da técnica de RNAi em eliminar o vírus da hepatite murina tipo 3 (MHV-3) *in vitro*. MHVs são vírus envelopados, cujo genoma é formado por uma cadeia de RNA fita simples (+) pertencentes a família *Coronaviridae*. Seu genoma codifica quatro proteínas estruturais: S (proteína da espícula); M (glicoproteína da membrana), N (proteína do nucleocapsídeo) e E (proteína associada à membrana). Neste trabalho foi escolhido como alvo para o silenciamento gênico a proteína N, tendo sido produzidas moléculas de dsRNA complementares a sua seqüência genômica (GenBank AF 201929). Foram obtidas duas moléculas siRNAs transcritas por T7 RNA polimerase e uma terceira molécula interferente sintetizada comercialmente.

Foi observado que os siRNAs produzidos pela transcrição *in vitro*, induziram uma resposta antiviral não específica. Além disso demonstrou-se que este efeito foi mediado através de substâncias secretadas no meio de cultura celular, provavelmente interferons (IFNs). Este efeito foi eficientemente eliminado após tratamento dos siRNAs com fosfatase alcalina. Observou-se também que a técnica de RNAi *in vitro*, tendo como alvo a proteína N de MHV-3, foi um tratamento eficaz e específico na infecção viral, confirmados através de estudos fenotípicos e moleculares. Desse modo, concluímos que experiências que utilizam RNAi contra alvos virais devem ser cuidadosamente monitoradas devido aos efeitos não específicos que podem ser induzidos por moléculas de dsRNA.

ABSTRACT

RNA Interference (RNAi) can be used as a powerful tool for post transcriptional gene-silencing mediated by double stranded RNA (dsRNAs) molecules. RNAi has a variety of biological applications including the combat against pathogens of biomedical importance. The objective of our study was to determine the efficiency and specificity of this new technique in eliminating mouse hepatitis virus type 3 (MHV-3) *in vitro*. MHV-3 is a subtype of enveloped viruses with a large plus-stranded RNA genome belonging to the Coronavirus family. Its genome codifies four structural proteins: S (spike protein); M (membrane protein); E (transmembrane glycoprotein); N (nucleocapsid protein). In the present study we target protein N by designing and producing dsRNA molecules complementary to its genomic sequence (GenBank AF 201929). We obtained three small interfering RNAs (siRNA) by *in house* T7 polymerase *in vitro* transcription and a fourth siRNA molecule that was commercially synthesized. We identified that siRNAs produced by *in vitro* transcription triggered a potent and sequence-unspecific antiviral response. In addition, we demonstrated that this antiviral effect was mediated through molecules that were secreted in medium culture, probably interferons (IFNs). This unspecific effect was efficiently suppressed when siRNAs were treated with alkaline phosphatase prior to *in vitro* experiments. We also observed that RNAi targeting the N protein of MHV-3 was a potent and specific treatment against *in vitro* infection, showing significant phenotypic protection and molecular evidence of specific gene-silencing. We concluded that experiments using RNAi against viral targets, although efficient, must be carefully controlled and monitored against possible sequence-unspecific effects triggered by dsRNA molecules.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Interferência por RNA - Histórico

Nos últimos anos, muitos mecanismos baseados no silenciamento por RNA, como por exemplo, silenciamento gênico pos-transcricional, co-supressão, repressão (“*quelling*”) e Interferência por RNA (RNAi) têm sido descobertos nos diferentes reinos (fungos, plantas e animais). Uma das mais interessantes descobertas foi o RNAi, um mecanismo de silenciamento pós-transcricional gene específico iniciado pela introdução de seqüências de RNA de dupla fita (dsRNAs). O fenômeno da RNAi foi primeiramente descoberto em plantas durante experimentos que demonstravam mudanças na pigmentação da petúnia. Introduzindo cópias adicionais de um gene responsável pela pigmentação nas flores, foi observado um resultado não esperado: as flores ficaram menos coloridas que as flores selvagens (de Lang *et al.*, 1995).

Mas a evidência mais concreta de que dsRNAs poderiam levar ao silenciamento veio de um trabalho realizado com nematódeos, após a descoberta de que a injeção de moléculas de dsRNA em *Caenorhabditis elegans* era suficiente para promover uma quase completa diminuição da expressão do gene homólogo aos dsRNAs injetados (Fire *et al.*, 1998). Após esta descoberta a RNAi tem sido amplamente estudada no meio científico, tanto sob o ponto de vista de seu mecanismo básico (Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001) como na sua utilização como uma ferramenta da biologia molecular (Yin & Wan., 2002).

RNAi também tem sido observada em outras espécies, incluindo plantas, fungos, protozoários, insetos (*Drosophila melanogaster*) e vertebrados. Estes trabalhos sugerem uma origem evolucionária deste fenômeno (Caplen *et al.*, 2001; Matzke *et al.*, 2001; Plasterk., 2002). A conservação do RNAi nos eucariotos claramente sugere um a resposta

adaptativa desses organismos, indicando que a RNAi pode ser uma forma primitiva de imunidade que protege o genoma de invasões de ácidos nucléicos exógenos, introduzidos por elementos genéticos, como vírus e transposons. Além disso, RNAi nunca foi relatada em procariotos, e assim pode-se afirmar que, provavelmente, este processo seja uma “inovação” nos eucariotos (Hannon., 2002).

Atualmente, RNAi tem sido usada como uma poderosa ferramenta na biologia molecular para o estudo da função gênica de muitos organismos modelos, incluindo nematódeos (*C. elegans*) (Fire *et al.*, 1998), insetos (Kennerdell *et al.*, 1998), parasitas (tripanossomas) (Ngo *et al.*, 1998) e camundongos (Wianny & Zernicka -Goetz., 2000).

1.2. Mecanismo de silenciamento -RNAi

Estudos genéticos e bioquímicos sugerem que a RNAi tem um mecanismo similar em muitos organismos e que as enzimas envolvidas neste processo exibem uma alta homologia nas espécies estudadas. O primeiro passo deste processo está associado com o aparecimento das moléculas de dsRNA na célula, que possuem uma seqüência perfeitamente homóloga ao do gene silenciado. O número mínimo de nucleotídeos na molécula de dsRNA para induzir o processo é de 26 nucleotídeos, entretanto, dsRNAs maiores são mais efetivos (Elbashir *et al.*, 2001). Por outro lado, transfecções com dsRNAs ao redor de 100 nucleotídeos em cultura de células de mamíferos induzem resposta de interferon (IFN), e pequenos dsRNAs, por volta de 20 nucleotídeos apenas induzem o processo de RNAi (Bass., 2000; Harborth *et al.*, 2001). Detalhes sobre a indução de IFN em células de cultura serão abordados no próximo tópico.

O mecanismo ocorre no interior das células, onde, os dsRNAs são reconhecidos pela enzima Dicer, que pertence a família das ribonucleases do tipo III (RnaseIII). Enzimas Dicer1 são evolutivamente conservadas, são encontradas em *D. melanogaster*, *C. elegans*, tabaco e mamíferos (Hannon., 2002) e são responsáveis pela clivagem dos dsRNAs em duplexes de 21 nucleotídeos denominados siRNAs (*small interfering RNAs*). Essas moléculas contêm uma porção terminal 3' hidroxil e 2 nucleotídeos protusos (overhang) em 3' e uma porção terminal 5' fosforilada. Estas características estruturais são muito importantes para os próximos estágios do mecanismo de RNAi (Chiu & Rana., 2002).

Os siRNAs produzidos pela Dicer são incorporados por um complexo de nuclease, o complexo de RNA indutor de silenciamento (RISC), que contém uma endoribonuclease que, através da seqüência codificada pela fita antisense do siRNA, encontra e destrói a seqüência complementar do RNA mensageiro (RNAm) (Fig. 1). O RNAm alvo é clivado em fragmentos com cerca de 22 nucleotídeos.

Quando a clivagem é completa, RISC e siRNA são liberados e podem ser usados em um novo ciclo de reconhecimento e clivagem. Nos invertebrados, os siRNAs funcionam como *primers* e o processo de silenciamento é auto-sustentável devido a ação de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), gerando um RNA complementar (dsRNAs), através da molécula de siRNA, que dará início novamente ao processo (Fig. 1). Esta etapa do processo não é observada em mamíferos (Dalmay *et al.*, 2000).

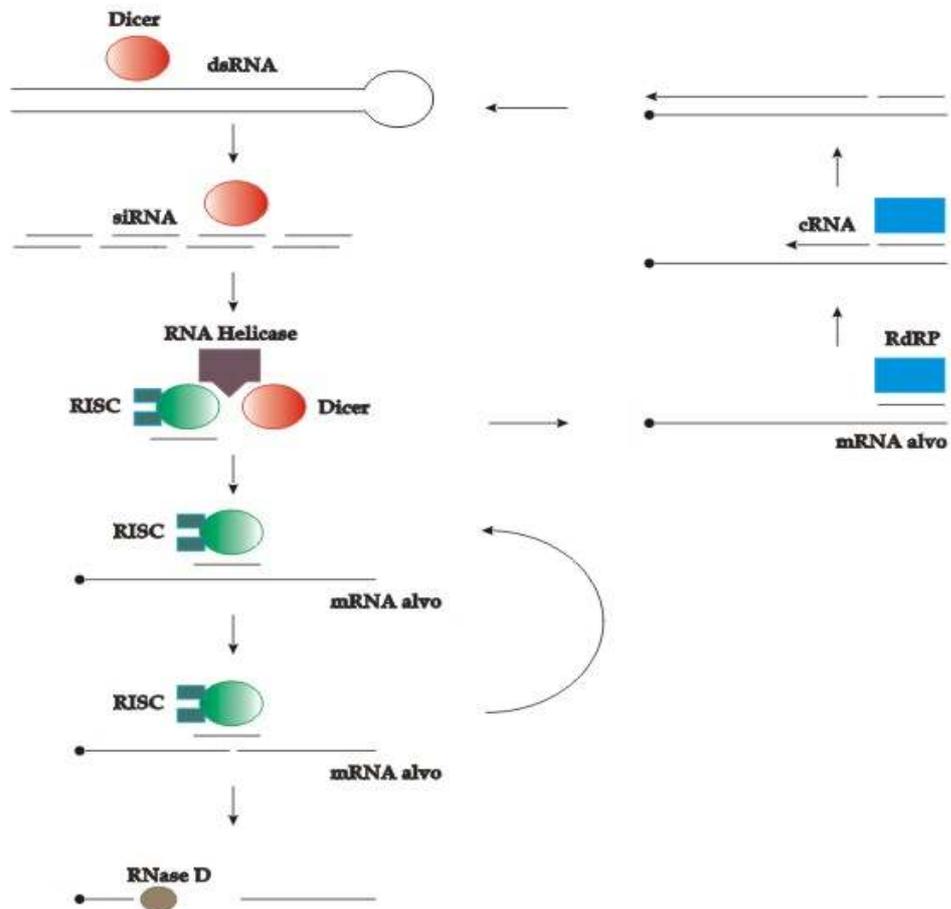


Figura 1. Via de silenciamento gênico pós-transcricional (RNAi). A enzima celular Dicer cliva os dsRNAs em siRNAs de 21 a 25 nucleotídeos. Os siRNAs são incorporados no complexo de RNA indutor de silenciamento (RISC), que usa a fita antisenso do siRNA para encontrar e destruir o RNAm alvo.

1.3. Aplicações Terapêuticas da RNAi

A técnica de RNAi pode ser direcionada para silenciar genes essenciais de qualquer patógeno. Isto pode ser alcançado sem afetar o hospedeiro, uma vez que a maioria absoluta dos estudos aponta RNAi como um fenômeno totalmente alvo-específico (Marathe *et al.*;2000; Mourrain *et al.*, 2000).

Terapias gênicas baseadas na técnica de RNAi, especialmente no tratamento de infecções virais tem se tornado cada vez mais interessantes e promissoras. Recentemente siRNAs foram usados, *in vitro*, para alterar o processo da infecção viral, pela inibição da expressão de antígenos virais e genes acessórios, controlando a transcrição e replicação do genoma viral e impedindo a montagem de partículas virais (Lindenbach & Rice., 2002)

O tratamento de vários tipos de cultura de células com siRNAs direcionados contra alvos celulares e virais e revelou papéis específicos de proteínas alvos nos processos de infecção e replicação viral (Fischer & Yin., 2004).

A habilidade da RNAi em elucidar papéis biológicos de fatores regulatórios virais e celulares envolvidos no controle da expressão de um gene viral foi constatada em trabalhos com HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida). Células tratadas com siRNAs direcionados contra os genes da HIV-tat e genes da transcriptase reversa ou contra a subunidade NF-kB p65 do hospedeiro, evidenciando diminuição da expressão de proteínas virais e celulares (Surabhi & Gaynor., 2002).

Quando células humanas e de camundongos foram pré-tratadas com siRNAs do genoma de poliovírus, a replicação deste vírus nestas células foi reduzida. Os autores concluíram que a técnica de RNAi, utilizando siRNAs correspondentes a seqüências virais, induz uma resposta antiviral efetiva (Gitlin *et al.*, 2002).

Outro estudo mostrou que siRNAs podem eficientemente silenciar componentes celulares, como a laminina AC, assim como o vírus da hepatite C (HCV) em linhagens celulares Huh-7 resultando em uma diminuição de 80% do RNA do HCV dentro de quatro dias (Randall *et al.*, 2003).

O vírus da Hepatite B (HBV) que causa uma infecção aguda e crônica no fígado humano também já foi alvo de estudo utilizando a técnica de RNAi. Konishi *et al.* (2003) utilizando uma linhagem celular que produz partículas do HBV (HepG2.2.2.15), realizaram transfecções com siRNAs específicos para o genoma viral. E relataram que siRNAs alvos contra antígenos da superfície e outras regiões inibiram a replicação do vírus da hepatite B.

Estudos realizados com o vírus da influenza utilizaram siRNAs alvos contra as proteínas do nucleocapsídeo (NP) e do complexo de transcriptase polimerase (PA e PB1) viral. Os siRNAs foram eficazes em células de cultura inibindo a replicação viral. Estes resultados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de transcrição e replicação destes vírus e juntamente com outras pesquisas que têm como objetivo usar os siRNAs para profilaxia e terapia do vírus da influenza (Ge *et al.*, 2003).

A eficiência da RNAi, também foi observada em trabalhos com os Paramyxovirus. Moléculas de siRNAs contra proteínas F, importantes para a fusão viral no processo inicial de infecção (formação de sincícios), foram eficazes na interferência da infecção viral, ocorrendo uma diminuição de sincícios. Estes resultados validaram o papel essencial da proteína F no processo de fusão celular dos Paramyxovirus (Britko& Barik., 2001).

A inibição da replicação de um herpesvírus, Anatid Herpes Vírus (AHV-1), foi também observada através siRNAs que promoveram o silenciamento viral em células de aves. A redução da replicação viral foi avaliada através do efeito citopático e quantificação viral (Malanna *et al.*, 2006).

Trabalhos recentes também evidenciam o uso desta metodologia para silenciar genes (em cultura) contra o vírus da SARS, um novo membro da família dos coronavírus, responsável pela síndrome respiratória severa aguda (SARS), considerada atualmente como uma das doenças humanas epidêmicas que ameaçam a saúde mundial. Zhang *et al.*, (2004) utilizando siRNAs direcionados contra proteínas da espícula (S) do vírus da SARS, constataram a diminuição da expressão gênica da proteína S em células 293T infectadas com o vírus. Tais resultados comprovam que a supressão de proteínas virais pela técnica de RNAi pode ser uma estratégia efetiva na terapia de infecções virais. Shi *et al.* (2005), realizaram estudos em cultura com siRNAs sintéticos contra proteínas estruturais, M, N e E do mesmo vírus e constataram que estes siRNAs foram capazes de inibir a expressão gênica do vírus e que pode ser considerado, futuramente, como uma nova estratégia terapêutica no tratamento da SARS.

Os trabalhos citados anteriormente, relatam a eficiência da técnica de RNAi na inibição de vários tipos de infecções virais, em cultura de células, tendo como alvo genes virais ou celulares. Ainda revelam papéis específicos das proteínas estudadas no

processo de invasão e replicação viral, contribuindo assim para um melhor entendimento das infecções virais.

Embora tenha ocorrido a inibição de alguns vírus como os poliovírus, HIV, influenza, SARS, através da introdução de siRNAs *in vitro*, muitas pesquisas necessitam ser feitas a fim de que seja estabelecido o papel do RNAi em uma infecção viral natural, e muitas questões necessitam ser esclarecidas antes que a tecnologia baseada na RNAi seja usada rotineiramente no tratamento de doenças virais.

1.4. O vírus da hepatite murina

O vírus da hepatite murina (*Mouse Hepatite Virus* - MHV), pertencente ao grupo dos Coronavírus, é o patógeno mais identificado em colônias de camundongos convencionais utilizados como modelo experimental. Sua descoberta foi descrita por Gledhill & Andrewes em 1951. Anos mais tarde, em 1968, foi introduzido o nome **coronavírus** por Tyrrel *et al*, baseada na morfologia de coroa que estes vírus apresentam quando observados na Microscopia Eletrônica de Transmissão. Em 1975, a família *Coronaviridae* foi estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral.

Os coronavírus, até o final de 2002, eram divididos em 3 grupos antigênicos, e classificados de acordo com o hospedeiro, seqüência nucleotídica e testes sorológicos. Fazem parte do grupo I, os coronavírus humanos, responsáveis por 30% dos resfriados comuns (HCoV-229E e HCoV- OC43). O vírus da hepatite murina (MHV) e coronavírus bovino (BcoV) estão inseridos no grupo II e o vírus da bronquite infecciosa (IBV) e coronavírus de peru (TCOV) pertencem ao grupo III. No fim de 2002 foi identificado um novo Coronavírus, o SARS-CoV, que causa a síndrome severa aguda respiratória (SARS), responsável por uma epidemia na China (Ksiazek *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores incluem este novo coronavírus no grupo II (Snijder *et al.*, 2003), enquanto outros criaram um novo grupo para estes vírus dentro dos Coronavírus (grupo IV), devido a diferenças identificadas no genoma deste vírus (Rota *et al.*, 2003).

Os coronavírus infectam superfícies de mucosas, causam doenças entéricas e respiratórias e podem provocar importantes perdas econômicas, particularmente em caso de infecções em bovinos e suínos. Além disso, induzem doenças hepáticas e do sistema nervoso central (MHV) e muitas vezes infecções sistêmicas (vírus da peritonite

infecciosa de felinos). Em condições experimentais, a susceptibilidade a infecção por coronavírus depende de fatores como background genético, idade do hospedeiro, tipo de vírus, dose e via de inoculação(Lavi *et al.*, 1986; Sidell *et al.*, 1995).

Os coronavírus são vírus grandes com 80 a 160 nm de diâmetro e formam um grupo de vírus patogênicos, envelopados que possuem o maior genoma dos vírus de RNA, constituído por uma molécula de RNA simples fita (+) de aproximadamente 30 kb (Lai & Holmes, 2001). A organização genômica dos coronavírus está representada na Fig.2.

O genoma desta família viral contém aproximadamente de sete a quatorze genes funcionais, sendo que dois genes codificam poliproteínas, 1a e 1b, requeridas para a síntese viral e acredita-se que seja uma das únicas proteínas virais que são sintetizadas do RNA viral genômico (as outras proteínas são traduzidas dos RNAsm subgenômicos). Quatro ou cinco genes codificam proteínas estruturais e oito genes são responsáveis pelas proteínas acessórias (Spaan *et al.*, 1998)

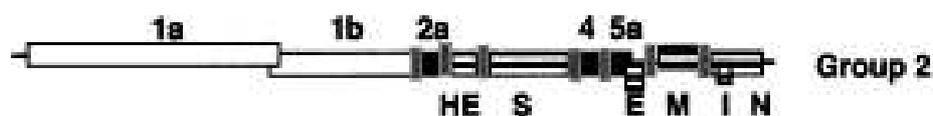


Figura 2. Organização genômica dos coronavírus do grupo 2. Notar a presença dos genes da replicase (ORF 1^a, 1b), genes estruturais (S, M, N e HE) e de genes não estruturais (Navas- Martin & Weiss., 2003)

Cada partícula viral é constituída por quatro proteínas estruturais além do RNA, conforme pode ser observado na Figura 3.

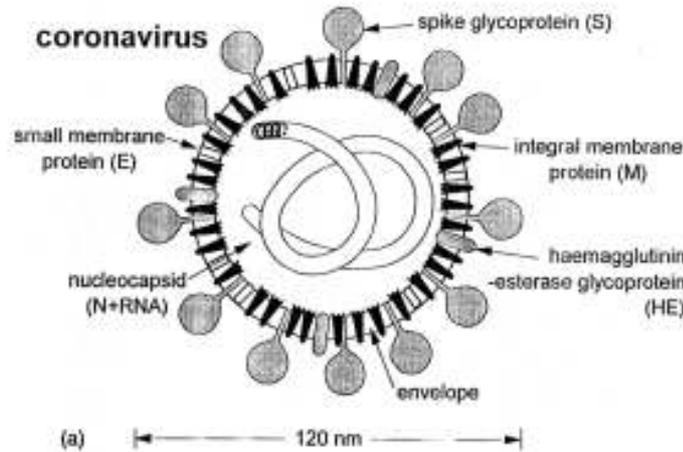


Figura 3. Morfologia da partícula viral de um Coronavírus. M (proteína da Membrana), S (glicoproteína da espícula), E (proteína menor da membrana), N (proteína do nucleocapsídeo) constituem as proteínas estruturais dos Coronavírus (Fonte: Sidell *et al.*, 1982)

A proteína da espícula, proteína S, uma glicoproteína de aproximadamente 180 kDa, localizada na membrana viral, é responsável pela formação das espículas e pela ligação da partícula viral à célula hospedeira, apresentando um importante papel na fusão do envelope viral com a membrana celular. O primeiro passo para o ciclo de infecção dos vírus envelopados é a interação com os receptores celulares e subsequente fusão com a membrana celular, processo mediado pela proteína S. Variações da proteína S entre os tipos de coronavírus são responsáveis pela mudança de hospedeiro e tropismo tecidual (Kuo *et al.*, 2000).

A proteína M, proteína da membrana que determina o sítio de ligação na membrana celular é essencial para a formação do envelope, interage com o nucleocapsídeo viral e induz a produção de interferon. A proteína E, proteína associada à membrana, é responsável pela montagem das partículas virais. Revestindo todo o RNA viral encontra-se a proteína do nucleocapsídeo, proteína N, que possui múltiplas funções que estão envolvidas com sinais nucleares, replicação viral, regulação da síntese e empacotamento de RNA. Em muitos coronavírus, a proteína N é altamente conservada, imunogênica e expressa em altas concentrações durante a infecção. Estas características fazem dela um alvo importante para a produção de anticorpos neutralizantes e diagnóstico (Kuo & Masters., 2002; Hiscox *et al.*, 2001).

Alguns coronavírus do grupo 2 (BCV, HCV-OC43, HEV, TCV e alguns tipos de MHV) expressam uma quinta proteína, a proteína HE (hemaglutinina-esterase), que forma pequenas espículas nos vírions, responsável pela aglutinação e adsorção do vírus a hemáceas de diferentes espécies animais. A função dessa proteína no ciclo viral ainda é desconhecida (Luytjes *et al.*, 1988)

O ciclo de replicação dos coronavírus (Fig.4) obedece a alguns passos, descritos abaixo:

1. O RNA viral (fita simples positiva) é imediatamente traduzido pela maquinaria da célula hospedeira. Apenas o primeiro gene, Orf 1ab (replicase) é traduzido e como resultado teremos a proteína RdRp (RNA polimerase RNA dependente);
2. A RdRp sintetiza a fita molde de RNA negativa, complementar ao RNA genômico;
3. A fita molde negativa também é usada para sintetizar um conjunto de RNAs mensageiros (RNAm) subgenômicos. Todos estes RNAm têm em comum a sua estrutura 3' terminal e se diferenciam no início, com um gene diferente na porção 5';
4. A fita molde é também usada para sintetizar o conjunto de fitas positivas dos RNAs subgenômicos;
5. Os demais genes dos RNAm serão traduzidos sequencialmente em proteínas S, E, M e finalmente N, que é a proteína do nucleocapsídeo;
6. O RNA mensageiro inteiro, sintetizado em adição aos RNAs subgenômicos, não é traduzido, sendo utilizado como material genético para a geração de outras partículas virais.

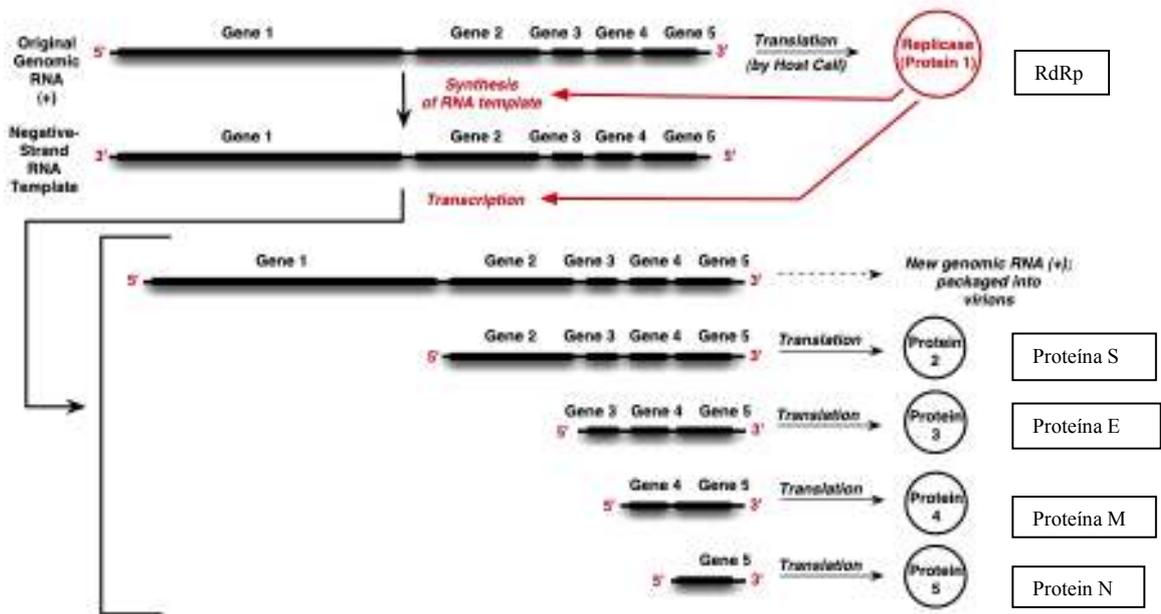


Figura 4. Diagrama mostrando o processo de replicação dos Coronavírus. Notar o papel das proteínas da Replicase e a formação dos RNAsm subgenômicos. (*Fields Virology 2001*)

O MHV é responsável por infecções murinas de difícil detecção e controle em animais de laboratório mantidos de forma convencional, ou seja, sem a presença de barreiras protetoras, tais como, isoladores, gaiolas protegidas por filtros. Várias variantes virais, que diferem na sua patogenicidade e antigenicidade, têm sido isoladas (Barthold & Smith., 1984; Bond *et al.*, 1979; Gilioli *et al.*, 1996; Taguchi *et al.*, 1982).

Trabalhos recentes sugerem que as diferentes variantes de MHV podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com o tropismo tecidual: os pleiotrópicos que replicam predominante no trato respiratório (MHV-1, MHV-3, MHV-JHM, MHV-

A59) e os enterotrópicos que replicam predominantemente no trato intestinal (MHV-Y, MHV-D e MHV-S/CDC). Entretanto, infecções de outros órgãos tais como fígado, cérebro e órgãos linfóides também podem ocorrer (Barthlod & Smith., 1992).

A alta prevalência em biotérios convencionais deve-se ao fato de a infecção ser subclínica, muitas vezes diagnosticada tardiamente. Assim, a infecção de animais de laboratório por MHV muitas vezes interfere nas pesquisas científicas, levando a interpretação errônea de resultados experimentais(Gilioli *et al.*, 1996).

1.5. Fator limitante da Interferência por RNA

RNAi tem permitido grandes saltos nos estudos funcionais de genes e tem sido uma nova esperança em terapias genéticas. Por exemplo, em *C. elegans*, aproximadamente 16.700 genes foram classificados funcionalmente utilizando-se a técnica de RNAi. Vírus que causam doenças como a AIDS e hepatite têm sido alvo de estudos muito promissores utilizando esta técnica. No entanto, estes avanços, como em qualquer outra tecnologia, vêm associados a dificuldades, relatadas, na maioria das vezes, em estudos com vertebrados. Muitas destas dificuldades estão associadas à manipulação das moléculas de dsRNA (com mais de 30 pb) em células de mamíferos, que ativam uma resposta mediada pela via de ativação de interferon (IFN) α e β levando a uma degradação de transcritos de RNA não específicos e interferindo na tradução de proteínas celulares (Karpala *et al.* , 2005).

Inicialmente, pesquisas conduzidas por Elbashir *et al.* (2001) demonstraram que siRNAs, diferentemente dos dsRNAs, não induziam esta via de ativação antiviral em mamíferos e, conseqüentemente, técnicas de silenciamento gênico por RNA avançaram rapidamente. Pesquisas mais recentes, entretanto, mostram mudanças nestes conceitos. Sledz *et al.*, (2003) demonstraram que a ativação de IFN α e β mediada pelas vias JAK-STAT e PKR (proteína kinase) é induzida após a introdução de siRNAs, produzindo assim efeitos inesperados e contraditórios, induzindo o silenciamento não específico, mas de grande importância, uma vez que siRNAs atualmente estão sendo estudados para serem usados em fins terapêuticos.

Kim *et al.* 2004 constataram que siRNAs sintetizados pela RNA polimerase do bacteriófago T7 podem desencadear uma potente indução de IFN α e β em uma variedade de linhagens celulares. A análise dos mediadores potenciais desta resposta revelou que a

porção 5`trifosfato, presentes nas moléculas de siRNAs após a síntese por T7, é importante para a indução de IFN. Esta descoberta foi realizada em experimentos que tinham como alvo o Herpes vírus (HSV-1), nos quais foi relatado que siRNAs não específicos para o vírus (irrelevantes), inibiam a infecção viral. Com estas observações, os pesquisadores sugeririam que algum componente da T7 polimerase induzia uma resposta antiviral, não seqüência específica. Para verificar se a resposta antiviral era mediada por IFNs, o sobrenadante das células transfectadas com siRNAs transcritos por T7 foram submetidas ao ensaio de ELISA, e concluiu-se que uma combinação de anticorpos para os IFNs α e β foram requeridos para neutralizar a inibição, sugerindo-se que os dois IFNs eram os mediadores da resposta antiviral. Ainda com o intuito de constatar qual era a parte da molécula que estava induzindo a produção de IFN. Moléculas de siRNAs sintetizadas industrialmente foram comparados com aqueles sintetizados por T7 e observou-se que estes possuíam uma porção 5`trifosfato na sua composição. Para remover este componente, as moléculas foram tratadas com fosfatase alcalina (CIAP). Logo após este procedimento as moléculas não induziam mais a produção de IFN que, portanto, eram induzidos devido a presença de 5`trifosfato. Assim, estes autores demonstraram que siRNAs transcritos em laboratório podem induzir uma resposta mediada por IFN, que por sua vez pode interferir em experimentos que utilizam a técnica de RNAi como ferramenta para o estudo de infecções virais.

Com estes últimos estudos, ficou comprovado o fato que siRNAs também podem induzir uma resposta mediada por IFN, assim com os dsRNAs. Portanto, mecanismos antivirais associados com a RNAi podem ser freqüentes e necessitam ser considerados, levando-se em conta que moléculas de dsRNA são potentes indutores de IFN em vertebrados (Manche *et al.*, 1992)

1.5.1 Ativação de IFN

A via de ativação de IFN é uma das respostas antivirais mais conhecidas. IFNs são uma categoria de citocinas, divididos em dois grupos. Apenas os IFNs do tipo 1, que incluem IFN α e β , são induzidas pelos vírus e constituem a primeira linha de defesa do organismo contra as infecções virais, protegendo as células vizinhas de infecção e bloqueando a infecção viral. Este processo ocorre devido a ativação de componentes da cascata de indução de produção de IFN (Fig. 6), como PKR e OAS (2'5' oligo A sintetase). A enzima OAS é ativada por dsRNA e por sua vez ativa produtos e uma endoribonuclease (RNase L), que provoca a destruição de diversos RNAs, favorecendo a inibição da síntese protéica (Karpala et al, 2005).

As dsRNAs também ativam PKR, que fosforila e inativa um fator de tradução eIF2. Esta ativação leva a uma inibição generalizada da tradução e pode alterar o metabolismo celular e muitas vezes ativa vias de apoptose. PKR é uma de muitas kinases nas células de mamíferos que podem mediar esta resposta (Fig. 5). Portanto, interações mediadas por dsRNAs podem ser decisivas no processo de multiplicação viral no hospedeiro.

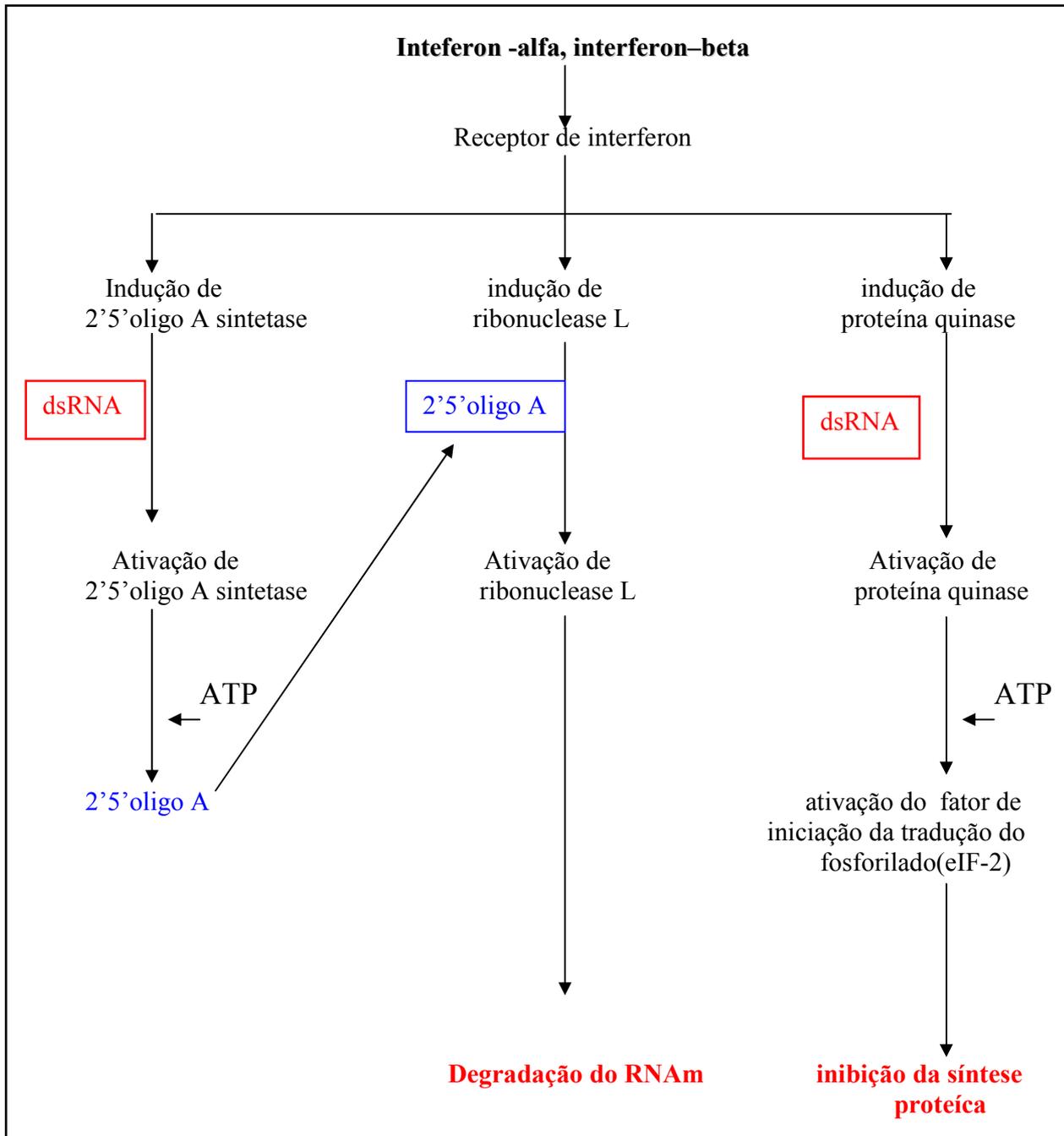


Figura 5. Mecanismo de ação anti viral de Interferon.

Atualmente a RNAi está sendo relatada como uma ferramenta ideal para inibir a replicação viral *in vitro*, uma vez que siRNAs alvos podem silenciar genes importantes de diferentes vírus. Diversos trabalhos demonstram a eficiência desta técnica, e várias referências bibliográficas descrevem algumas limitações que podem interferir na eficiência e especificidade da RNAi no estudo de infecções virais (Karpala *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004).

Todos esses fatores levaram-nos a avaliar a técnica de RNAi contra uma infecção viral, utilizando o MHV-3 como modelo experimental. Espera-se que os dados obtidos nos experimentos realizados no laboratório de Genética Molecular/ FCM/ UNICAMP adicionem informações importantes sobre o uso da RNAi no contexto das infecções virais.

II. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência e a especificidade da técnica RNAi no controle da infecção pelo vírus da hepatite murina tipo 3 (MHV-3) *in vitro*.

Os objetivos específicos do trabalho incluíram a:

- ✓ Comparação da eficiência das diferentes moléculas interferentes desenhadas para o MHV-3;

- ✓ Observação do efeito antiviral de moléculas de siRNAs pela avaliação fenotípica das culturas celulares infectadas por MHV-3;

- ✓ Confirmação do silenciamento gênico através de técnicas moleculares.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho dos siRNAs sintetizados por T7 RNA polimerase

As seqüências genômicas de MHV foram obtidas no GenBank (AF 201929). Foi escolhido como alvo a proteína N, do nucleocapsídeo do MHV-3 importante na formação da partícula viral e na regulação da síntese do RNA. Em seguida, as seqüências nucleotídicas foram alinhadas (independentemente) no programa **Clustal X**, onde SNP (single nucleotides polymorphisms) foram identificados.

Esse passo é importante para evitar regiões polimórficas, pois um único mal-pareamento do siRNA com o RNA alvo pode impedir a clivagem por RISC. Escolheu-se então uma seqüência de 21-mer com estrutura GN₁₇CN₂ (pré-requisito do protocolo de transcrição *in vitro* utilizado neste projeto) (Donze & Picard., 2002), com o objetivo de se obter uma eficiente transcrição durante o processo de síntese dos siRNAs (descrito no próximo tópico). Após esta seleção foi usado o programa “**blast search for short nearly exact matches**” (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), para eliminarmos os siRNAs que eventualmente fossem complementares a transcritos do camundongo. Logo após este procedimento, os oligos selecionados foram analisados quanto sua estrutura secundária no subprograma **Oligo**, do programa **Gene Runner**. Por fim deu-se preferência aos oligos que apresentavam na sua estrutura a porcentagem de GC entre 45 e 55% sendo evitadas seqüências de baixa complexidade e siRNAs próximos entre si.

Foram obtidos dois siRNAs, denominados 634 e 910 de acordo com a posição no RNA mensageiro. A seqüência do promotor da T7 RNA polimerase foi inserida na extremidade 3' dos oligonucleotídeos acima mencionados, para a posterior utilização no protocolo de transcrição *in vitro*.

As seqüências do oligo T7 e os oligos escolhidos para o uso neste projeto, inclusive os controles utilizados (mutados e irrelevantes) são:

Oligo T7:

5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'

Template 634s:

5' GCG CTA GAA GCA GTT CCA ACC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 634as:

5' CTG GTT GGA ACT GCT TCT AGC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 910s:

5' GTG ATC CGC AGT TCC CCA TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 910as:

5' AAG AAT GGG GAA CTG CGG ATC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 5 si RNA *S. mansoni* (irrelevante)

5' AAGCATAGCCAACGACAAATCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Template 6 si *S. mansoni* (irrelevante)

5' TCGATTTGTCGTTGGCTATGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Template 7 Human ERAF (irrelevante)

5' AGG AAG TCC CTG TAC TTG GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 8 Human ERAF (irrelevante)

5' CTG GCC AAG TAC AGG GAC TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

3.2 Síntese dos siRNAs por transcrição *in vitro* por T7 RNA polimerase

Para a obtenção de siRNAs que foram utilizados nos experimentos *in vitro*, os oligos foram primeiramente ressuspendidos em água ultrapura, foram anelados com o oligo da T7 RNA polimerase, aquecidos e depois submetidos à reação de transcrição *in vitro*. Neste processo os siRNAs foram produzidos a partir de oligos de DNA de 40 nt (Yu *et al.*, 2002). Estes oligos apresentam uma região que funciona como um promotor para a T7 RNA polimerase, ocorrendo, desse modo, a síntese de um oligo de RNA de 21 nt (fig.6). Cada oligo de RNA gerado foi anelado com o seu correspondente. A reação de transcrição *in vitro* foi feita de acordo com as instruções do fabricante (Ampliscribe™ T7 transcription Kit; Epicentre, Madison, Wisconsin, USA).

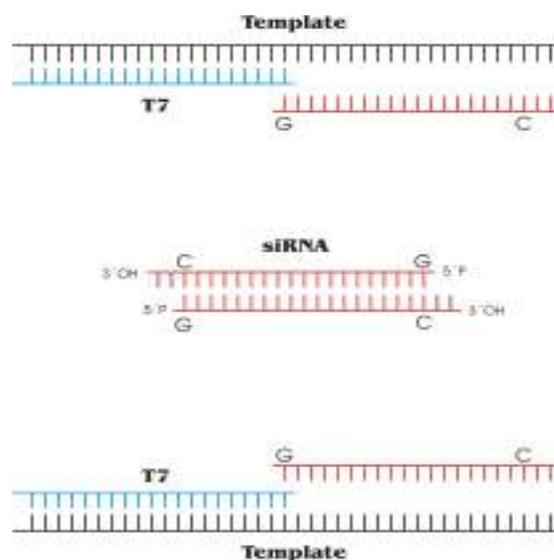


Figura 6. Síntese de siRNAs através da transcrição *in vitro* por T7 RNA polimerase. Os oligos anelam-se ao promotor T7, formam um duplex que terá a função de promotor para T7 RNA polimerase. Em vermelho os oligos gerados.

3.3. Tratamento com fosfatase alcalina e purificação dos siRNAs

O tratamento para retirada de resíduos de trifostato dos siRNAs sintetizados foi feito de acordo com o protocolo de *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal* (CIAP) da Promega (Madison, Wisconsin, USA), após a quantificação dos siRNAs. Para isso, primeiramente ocorreu a purificação dos siRNAs através da precipitação em etanol, depois o precipitado foi ressuspenso em 40 μ L de 10 mM Tris-HCl e incubado a 37°C por 30 minutos. Logo em seguida adicionou-se uma nova alíquota de CIAP diluída em tampão (do fabricante) e foi feita uma nova incubação por 37°C por mais 30 minutos. Finalmente adicionou-se 300 μ L do tampão e os siRNAs foram purificados com Acetato de Sódio 0,3 M e etanol, com a finalidade de eliminar proteínas e nucleotídeos livres, tóxicos às células da cultura.

Depois de tratados com fosfatase alcalina e purificados, os siRNAs foram quantificados em espectrofotômetro (Gene Quant –Amersham Biosciences) .

3.4. Desenho dos siRNAs sintéticos

O desenho dos siRNAs sintéticos foi feito baseado no Programa *Strand Analysis*, desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular, FCM/ UNICAMP. Neste programa utiliza-se, para o desenho dos siRNAs, os mesmos parâmetros descritos nos desenhos dos siRNAs sintetizados pela T7 RNA polimerase (descrito anteriormente), com a diferença de que se adiciona mais uma análise, o cálculo da energia livre (ΔG), para a avaliação da eficiência dos siRNAs na RNAi.

Estudos relacionados com o mecanismo da RNAi, relatam que a eficiência do silenciamento está diretamente ligada à transferência da fita antisenso com a extremidade 5' menos estável para a RISC. Sendo assim, uma baixa eficiência no silenciamento acontecerá

se a fita senso for transferida para a RISC, ou seja, se ela for menos estável que a fita antisenso. Desse modo, a análise da estabilidade termodinâmica das extremidades das fitas senso e antisenso dos siRNAs é um passo importante para a escolha de um siRNA eficiente (Schwars *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003).

O valor de G é definido pelos quatro primeiros pares de base de cada extremidade (Khvorova *et al.*, 2003). O ΔG da molécula será a diferença da somatória dos valores de G da porção 5' do oligo antisenso com a somatória dos valores de G da porção 5' do oligo senso, ou seja:

$$\Delta G = \sum_{G_{as}} - \sum_{G_s}$$

Portanto se $\Delta G \geq 0$, a fita antisenso será preferencialmente transferida para a RISC e conseqüentemente mais eficiente será o silenciamento gênico .

Com base neste programa, analisando o ΔG das moléculas, foram desenhados dois siRNAs: siRNA N, tendo como alvo a proteína do nucleocapsídeo do MHV-3; e siRNA GFP (*green fluorescent protein*). O siRNA GFP foi utilizado como controle irrelevante de nossos experimentos. As seqüências do siRNAs desenhados estão abaixo e os oligos foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc, Coralvill, USA*).

siRNA N (890)

5' GAG GCU CUG AAA UGU UAA AAC 3'

5' UUU AAC AUU UCA GAG CCU CCA 3'

siRNA GFP

5' GAC'GGG AAC UAC AAG ACA CGU 3

5' GUG UCU UGU AGU UCC CGU CAU3'

3.5. Cultura celular e transfecção da monocamada celular

Células da linhagem L-929, susceptíveis ao vírus MHV-3, foram cultivadas em frascos de vidro neutro (Frascolex, Brasil) de 75 cm² a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO₂. O meio de cultivo celular utilizado foi MEM-Eagle (Nutricell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), 100 U.I/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina. Após a confluência da monocamada celular, as células foram ressuspensas por tripsinização e diluídas em meio MEM-Eagle suplementado com SFB e solução de antibióticos, conforme descrito acima, para uma concentração de 1x10⁴ células/mL. Foi adicionado 1,0 mL da suspensão de células obtida em cada orifício da placa de 24 orifícios (Costar, USA) que foi mantida a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ v/v por 24 horas.

A transfecção com siRNAs e com Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Califórnia, USA) foi realizada em monocamada celular com 40% de confluência, de acordo com protocolo do fabricante. Para cada orifício da placa de 24 orifícios, foram utilizados 2µL de Lipofectamina 2000 diluída em 150 µL de MEM-Eagle, incubado por 45 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foi adicionada o siRNA diluído em 100 µL MEM-Eagle, com incubação por mais 15 minutos à temperatura ambiente. O meio de cultura foi retirado e a monocamada celular foi lavada com Salina Fazéka pH 7,2. Em seguida a mistura lipofectamina-siRNA, juntamente com 400 µL de MEM-Eagle, foi colocada em cada orifício da placa contendo a monocamada celular e foi mantida por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO₂.

Nos experimentos com os siRNAs sintetizados por T7 RNA polimerase, utilizou-se 270ng de siRNA por orifício. Nos ensaios realizados com os siRNAs sintéticos foram

utilizadas diferentes concentrações de siRNAs (135ng, 162ng, 189ng, 243ng e 279ng) por orifício da placa de cultura.

3.6. Determinação da TCID₅₀ e Infecção da monocamada das células L-929 com MHV-3 após transfecção

Uma alíquota do sobrenadante da cultura de células L-929 infectadas por MHV-3 foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal do CEMIB-UNICAMP. Esta alíquota foi expandida, através da infecção de monocamada de células L-929, para determinação da dose infectante 50% para cultivo celular (TCID₅₀). Para isto, monocamadas de células L-929 foram tripsinizadas e ressuspensas em MEM-Eagle contendo 10% SFB, 100 U.I./ml de penicilina e 100 µg de Estreptomicina, de forma a conter 2x10⁵ células/mL. Em placas de 96 orifícios (Costar, USA), foram adicionados 100 µL da suspensão de células que foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v CO₂ por 24 horas. Após sucessivas lavagens com solução de salina Faséka, pH 7,2, foram adicionados 100 µL da amostra de MHV-3, testadas em quadriplicata, das diferentes diluições na razão 10. Como controle negativo da reação foi utilizada monocamada de células L-929 não infectadas. A observação do efeito citopático foi realizada 24 horas após infecção (hpi) e o título viral expresso como 1TCID₅₀ foi determinado de acordo com o método de Reed & Muench (1938).

Vinte e quatro horas após a transfecção, as monocamadas de células L-929 foram submetidas a sucessivas lavagens com solução salina Faséka, pH 7,2, infectadas com 200 µL da suspensão do MHV-3 contendo 1TCID₅₀ (10^{-7,5}) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO₂ durante duas horas. Após o período de adsorção, a

suspensão viral foi retirada e foram adicionados 500 µL de MEM-Eagle em cada orifício da placa de 24 orifícios. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5 % v/v de CO₂ por 48 horas. As monocamadas celulares foram observadas quanto a ocorrência de efeito citopático 24 a 48 hpi e fotografadas em aumento final de 250 vezes com uso de máquina fotográfica digital modelo Coolpix 2000 (Nikon, USA).

3.7. Definição dos ensaios realizados

Os experimentos foram divididos em 2 grupos distintos: no grupo 1 foram incluídos os siRNAs sintetizados por T7 polimerase (siRNA 634, siRNA 910, siRNA *S. mansoni* e siRNA *ERAF*). No grupo 2 foram incluídos os siRNAs sintéticos (siRNA N e siRNA GFP).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se como controles células L-929 não transfectadas e não infectadas e células L-929 infectadas com 1TCID₅₀ do MHV-3.

3.8.Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada com a utilização do TRIzol LS (#10296-010, Invitrogen, Califórnia, USA), conforme técnica descrita pelo fabricante. Para cada 500 µL da suspensão de células L-929 foi adicionado 1mL de TRIzol. Após a incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, incubando-se por mais 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C (Eppendorf 5402, Rotor F 45-30-11, USA) para coleta da fase aquosa.

O RNA da fase aquosa obtida foi precipitado com 500 µL de isopropanol a 4 °C por 10 minutos e foi feita a centrifugação a 12.000rpm (Eppendorf 5402, Rotor F 45-30-11, USA) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de etanol 75%. Após agitação em aparelho tipo *vortex* (PHOENIX, USA) por 15 segundos, o material foi centrifugado, nas mesmas condições descritas acima, por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o etanol foi descartado e o RNA precipitado foi ressuspensionado em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, GIBCO BRL).

3.9. Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR)

A reação de transcrição reversa (RT) foi feita com o Kit Superscript III polymerase (Invitrogen, Califórnia, USA). O cDNA foi amplificado pela técnica de PCR e os primers desenhados para amplificação da região correspondente à proteína N do MHV-3, foram: '5-CTG GTA ATG GCA TCC TCA AGA-3' e '5-TTG GCG CTT TGC TTA GTT ACC-3'. Os *primers* desenhados para amplificação da α tubulina, utilizados como controles internos da reação, foram: 5'-CTC TCT GTG GAT TAC GGA AAG -3' e 5'- GGT GAT CTC TGC TAC AGA AAG- 3'.

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR foi realizada utilizando a enzima SuperScriptIIITM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Califórnia, USA). Dois microgramas de RNA extraído das células L-929 foram incubados com 1 µL de *primer reverso da proteína N* (10 µM) IDT(*Integrated DNA Technologies, Inc, Coralvill, USA*), 1 µL de dNTP mix (10 mM) de água para um volume de 14µL, a 65°C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4 µL de 5x *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT (0,1M) e 200U da enzima *Superscript III RT* (Invitrogen, Califórnia,

USA), sendo a amostra incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

Na reação de amplificação foram utilizados 2 µL de cDNA sintetizado anteriormente, 1 µL dNTP(10 mM), 2 µL de cada primer (10 µM), 3 µL de MgCl₂ (25 mM) e 0,4 µL da enzima *Taq DNA* polimerase (Invitrogen, Califórnia, USA). Em seguida as amostras foram submetidas a um programa de amplificação que consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e finalmente 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

As reações de RT-PCR para amplificação das regiões correspondentes à proteína e a α -tubulina foram realizadas em reações separadas no termociclador (MJ Research PC-100). Para a visualização dos produtos obtidos pelo PCR, 10 µL do amplificado, e 4 µL do marcador molecular (Invitrogen, Califórnia, USA) foram aplicados em um gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 2M com 17µL de *Syber Green* (Invitrogen, Califórnia, USA). A corrida eletroforética foi realizada a 80V por 45 minutos. As bandas foram visualizadas em transluminador de ultravioleta e fotodocumentadas.

Nesta metodologia foi feita a análise das células transfectadas com os siRNAs sintéticos (N e GFP). Como controle positivo foi utilizado o experimento com células infectadas com MHV-3.

3.10. PCR em Tempo Real

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando a enzima SuperScriptIII™ *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Califórnia, USA). Dois microgramas de RNA extraído das células L-929 foram incubados com 250ng de *primers* randômicos (Invitrogen, Califórnia, USA), 1 µL de dNTP mix (10 mM) de e água para um volume de 14µL, a 65°C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4µL de 5x *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT (0,1M) e 200U da enzima Superscript III RT, sendo a amostra incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, California, USA), que é constituído por um par de *primers* (F 5'GCCCCGGCACGGTATTG 3' e R 5'AGACCTTCCCGAGCCTTCTA 3') e uma sonda marcada com fluoróforo (5'CCTCAGGGCTTTTATG 3'). Essa sonda é marcada com o fluoróforo FAM™ e está localizada na posição 544 da seqüência do gene da proteína N. O controle endógeno escolhido foi o *GAPD* (*gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*), o qual vem marcado com o fluoróforo VIC™.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625 µL da solução de *primers* e sonda, 1,625 µL de água e 4,0 µL de cDNA (40 ng). Os reagentes, com exceção do cDNA, foram todos pipetados dentro de um fluxo laminar (livre de ácidos nucleicos), a fim de proteger os reagentes de contaminação de cDNA de experimentos anteriores. Para todas as corridas e

para cada par de *primers* foi feito um “branco” (reação com todos os reagentes e água substituindo o cDNA). As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo.

Para se iniciar a quantificação relativa das amostras é necessário primeiramente fazer a validação dos *primers* utilizados, tanto para o gene de interesse quanto para o controle endógeno, calculando a eficiência da amplificação de ambos e posteriormente normalizando os dados do gene de interesse com os dados do controle.

A eficiência é calculada através da fórmula:

$$E = 10^{(-1/slope)} - 1,$$

onde *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*, servindo como base para comparação entre amostras) (Figura 7). O valor da eficiência deve ser $1 \pm 0,1$, ou seja, próxima a 100% e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R², também gerado a partir da curva padrão, indica o quanto as réplicas estão parecidas, ou seja, indica o grau de confiabilidade dos dados. Este valor deve ser maior que 0,95, o que indica acima de 95% de confiabilidade.

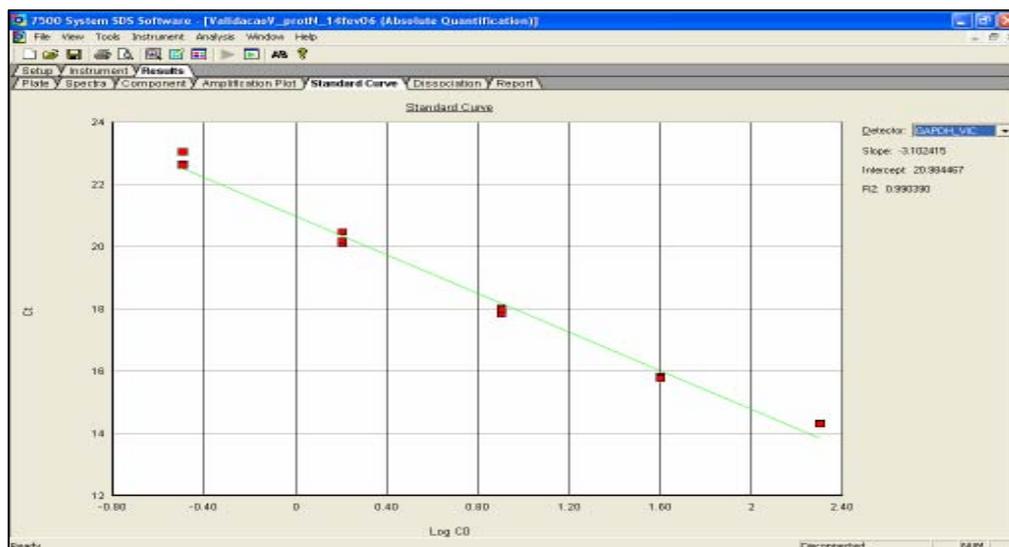


Figura 7. Tela do aplicativo “7500 System SDS Software” mostrando a curva padrão gerada a partir do log da concentração das amostras (eixo X) e os Cts (eixo Y). Notar quadro destacando o valor de *slope* (inclinação da reta) que é utilizado no cálculo da eficiência da amplificação.

Para a placa de validação do gene da proteína N foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA (amostra de células infectadas com MHV-3) em seis concentrações diferentes (1000ng, 200ng, 40ng, 8ng, 1,6ng, 0,32ng), utilizando os *primers* para a proteína N e para *GAPD*, em reações separadas. Essa grande variação de concentrações nos permite conhecer se, posteriormente, poderemos trabalhar com segurança com possíveis amostras que tenham a expressão muito baixa, por exemplo.

Nos ensaios de quantificação relativa do Real-Time PCR utilizamos a concentração de 40 ng de cDNA.

Após o cálculo das eficiências de amplificação dos genes alvo e endógeno foi construída, como indicado pelo protocolo, uma curva (fora do aplicativo do ABI 7500). No eixo X foram colocados os mesmos valores de *log* da concentração das amostras e no eixo Y a diferença entre a média do Ct do controle endógeno e a média do Ct do gene de interesse, normalizando a amplificação do gene alvo e do endógeno. O valor da inclinação

da curva deve ser menor que 0,1. Com base nos resultados obtidos, na validação do gene da proteína N, utilizamos nos experimentos de quantificação relativa a concentração de 40ng de cDNA, para cada amostra experimental.

Nesta metodologia foi feita a análise dos experimentos realizados com siRNAs sintéticos. Como controle positivo e negativo da reação foram utilizadas células L-929 infectadas com MHV-3 e células L-929 normais respectivamente.

3.11. *Western blot*

Sobrenadantes das células L-929 transfectadas com o siRNA alvo e posteriormente infectadas, foram congeladas e, quando descongeladas foram quantificadas pelo método Bradford (1976). As amostras proteicas de cada experimento foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl, 2-Mercaptanol, Glicerol, SDS, Bromofenol 0.1% e água), aquecidas a 95° C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE - 10,5%), conforme descrito por Laemmli (1970). Em cada poço do gel foi aplicado 40µg de proteína de cada amostra. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 100 V por 2 a 3 horas.

As proteínas virais foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Immobilion-P transfer membrane/ Millipore) a 30 Volts por 2 horas em uma solução tampão de transferência contendo 0.125 M Tris, 0.192 M Glicina, pH 7.2, e, logo depois foi realizado o bloqueio da membrana com leite desnatado (Molico, Nestle, Brasil) a 5% p/v em TBS contendo 0,1% de *Tween* 20, por 2 horas. A membrana foi incubada durante uma noite à temperatura ambiente com 4 mL de soro hiperimune anti-MHV-3 diluído 1/250 em solução tampão TBS contendo leite desnatado (Molico, Nestle, Brasil) a 5% p/v.

Após realizadas 3 lavagens sucessivas com TBS foi realizada a incubação com anticorpo secundário utilizando-se anticorpo IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, USA) na diluição de 1/10.000, durante 60 minutos. A membrana foi em seguida incubada com o substrato BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) e o cromógeno NBT (nitro-blue tetrazolium) para desenvolvimento da coloração. Todos esses procedimentos finais foram executados à temperatura ambiente.

Além dos grupos experimentais, foram utilizados como controle positivo o sobrenadante de células L-929 infectadas com 1TCID₅₀ do MHV-3 e como controle negativo o sobrenadante de células L-929 não infectadas com MHV-3.

IV. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.1.1 Análise das Transfecções com siRNAs Transcritos por T7 RNA Polimerase por Microscopia Óptica

Conforme demonstrado nas figuras abaixo os siRNAs específicos (634 e 910) (Figs. 9 e 10), foram capazes de bloquear a infecção com o vírus MHV-3 das monocamadas de células L-929 após transfecção, fato este que não ocorreu com as monocamadas de células L-929 somente infectadas com o MHV-3 (Fig.8B). Nesta figura pode-se observar o efeito citopático do MHV-3, caracterizado pela formação de sincícios e posterior destruição do tapete celular.

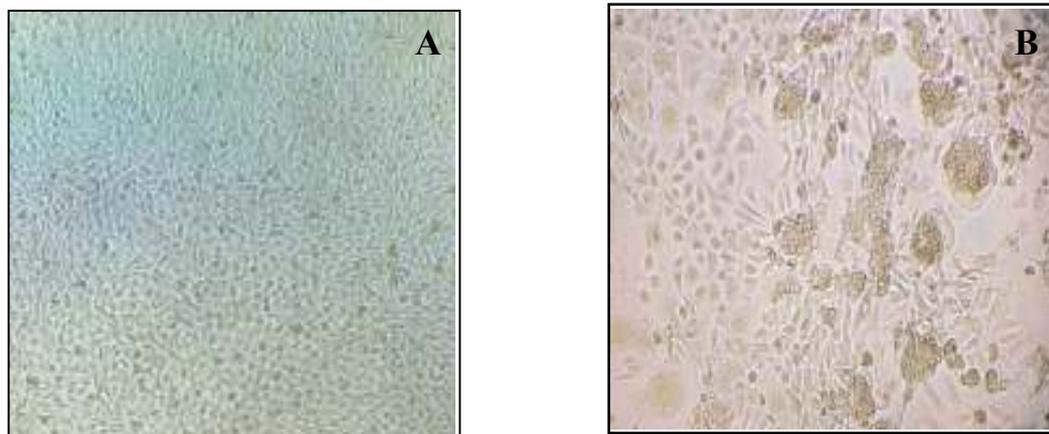


Figura 8. Células L-929. Controle negativo (A) . Células L-929 infectadas com 1 TCID₅₀ do MHV-3. Controle positivo (B). Aumento 250 x.



Figura 9. Células L-929 transfetadas com o siRNA 634 e infectadas com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpt). Aumento 250x

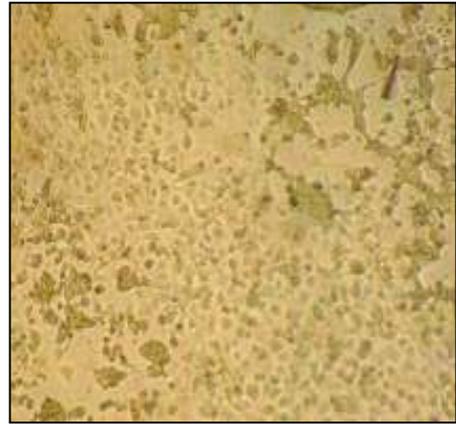


Figura 10. Células L-929 transfetadas com o siRNA 910 e infectadas com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpt). Aumento 250x

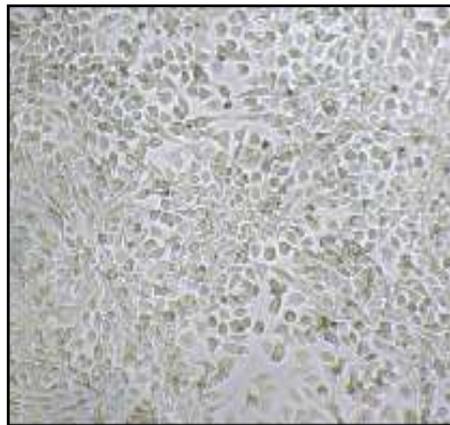


Figura 11. Células L-929 transfetadas com o siRNA irrelevante (*S. mansoni*) e infectadas com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpt). Aumento 250x

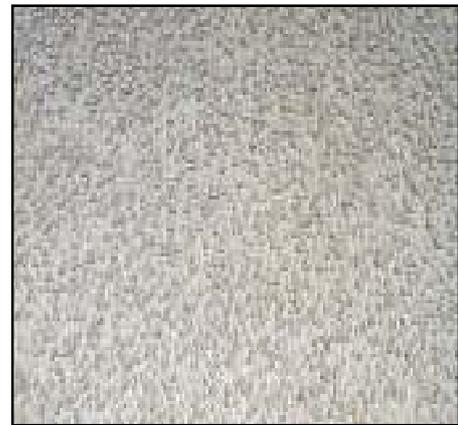


Figura 12. Células L-929 transfetadas com o siRNA irrelevante ERAF e infectadas com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

O siRNA 634 mostrou-se mais eficiente no controle da infecção pelo vírus MHV-3. Na monocamada celular transfectada com o siRNA 634 foi observada uma quantidade menor de sincícios (Fig.9) do que na monocamada das células transfectadas com o siRNA 910 (Fig.10).

Os desenhos destes siRNAs alvos (634 e 910) para a proteína N do MHV-3 foram feitos com base em alguns parâmetros, mas não foi feita análise da Energia Livre destas moléculas. Parâmetro este, usado meses depois com a implementação do programa *Strand Analysis* no Laboratório de Genética Molecular/ FCM/UNICAMP. Quando foi feito o cálculo do AG destas moléculas, após os resultados obtidos na análise fenotípica, determinou-se que o siRNA 634 possuía um ΔG maior ($\Delta G = 0$) do que os siRNAs 910 ($\Delta G = -2,7$), confirmando desse modo, que o siRNA 634 é menos estável, portanto potencialmente mais eficiente no controle da infecção viral.

Os resultados da análise fenotípica dos siRNAs 634 e 910 juntamente com a análise da Energia Livre, demonstram a importância de utilizar um programa específico e com alguns parâmetros importantes (como o ΔG) para o desenho de siRNAs.

Nestes primeiros experimentos observamos também que as células L-929 transfectadas com siRNAs *S. mansoni* e ERAF (irrelevantes) (Fig.11 e 12) estavam muito parecidas com as células L-929 controle (Fig.8), sendo que deveriam estar semelhantes as células controle infectadas apenas com o MHV-3 (Fig. 8B).

Kim *et al.*, (2004), utilizando a técnica de RNAi para o silenciamento do vírus da herpes (HSV-1), também observaram que os siRNAs irrelevantes (não sequência específicos) induziam o silenciamento viral. Os autores descreveram um método, com a finalidade de diminuir a resposta ao IFN e manter a eficácia dos siRNAs, utilizando para

isso o tratamento dos siRNAs sintetizados com CIAP (calf intestine fosfatase), que elimina o trifosfato. Viabilizando-se o uso correto dos siRNAs transcritos por T7 polimerase, ou seja, demonstrando a real especificidade dos siRNAs.

O fato dos siRNAs não seqüência-específica mostrarem-se eficientes no controle da infecção celular pelo MHV-3 (ausência de efeito citopático característico), pode estar relacionado à indução de produção de interferon alfa e beta após a transfecção. Com o objetivo de eliminar algum indutor, possivelmente a porção 5' trifosfato das moléculas sintetizadas no nosso laboratório, utilizamos a técnica descrita por Kim *et al* . 2004 para tratamento dos siRNAs (tratamento dos siRNAs com CIPA; (item 3 - Materiais e Métodos) e repetimos as transfecções com os siRNAs tratados. Nestes experimentos foi observada a eliminação do efeito antiviral não específico na monocamada de células L-929 transfectadas com os siRNAs *S. mansoni* e ERAF(Figs.13 a 16).

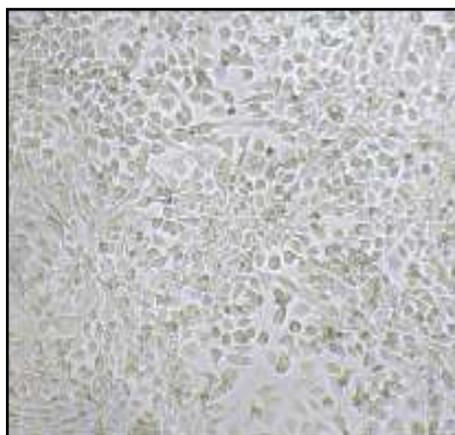


Figura 13. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante (*S. mansoni*) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

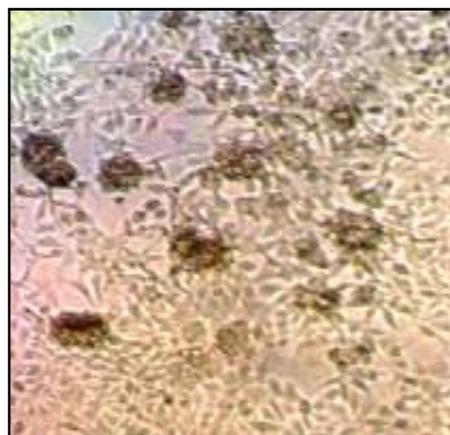


Figura 14. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante (*S. mansoni*) /CIAP e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 15. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante *ERAF* e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

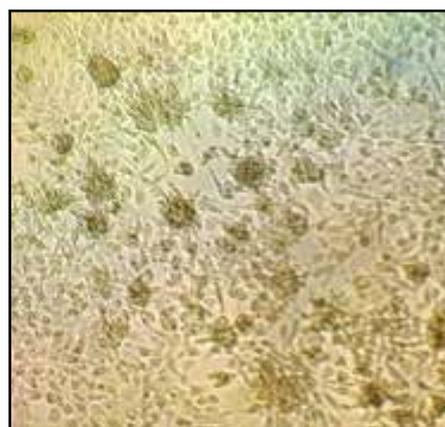


Figura . 16. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante *ERAF*/CIAP e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

O tratamento com CIAP foi feito com todos os siRNAs, sendo que o resultado das transfecções com os siRNAs alvos tratados com CIAP foi semelhante com os siRNAs não tratados, confirmando assim os resultados observados anteriormente (Figs. 17 a 20).

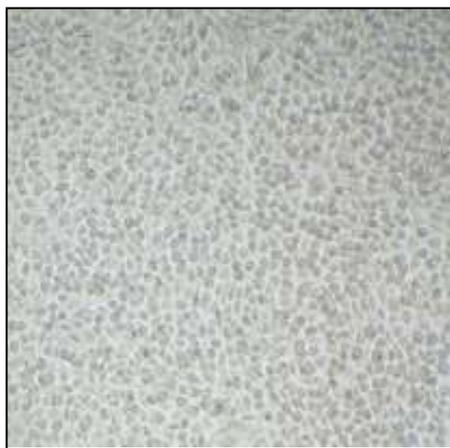


Figura 17. Células L-929 transfectadas com o siRNA 634 e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

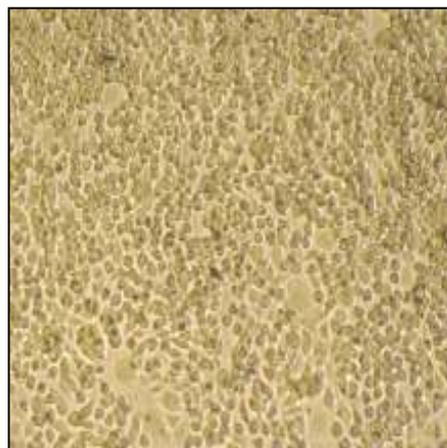


Figura 18. Células L-929 transfectadas com o siRNA 634 /CIAP e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

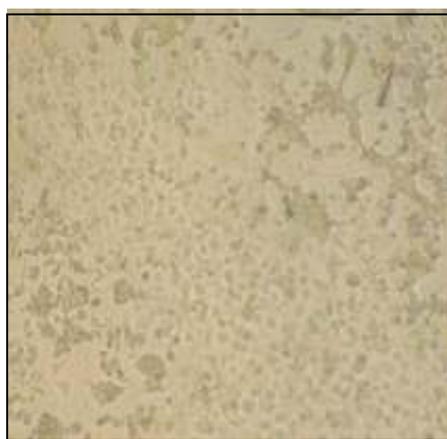


Figura 19. Células L-929 transfectadas com o siRNA 910 e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 20. Células L-929 transfectadas com o siRNA 910 /CIAP e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Além desse tratamento, o meio de cultura das células transfectadas com os siRNAs sintetizados por T7 RNA polimerase sem tratamento com CIAP foi transferido para uma nova cultura de células L-929 não transfectadas e após 24 horas procedeu-se a infecção com MHV-3, tendo sido observado a inibição da infecção viral. O efeito de proteção antiviral observada nas transfecções com siRNAs sintetizados por T7 RNA polimerase pode ter sido devido a moléculas que foram secretadas no meio celular durante estes ensaios.

4.1.2. Análise das Transfecções com siRNAs Sintéticos por Microscopia Óptica

Com a aquisição de novos siRNAs alvos para as proteínas N e siRNA irrelevante (GFP) sintetizados industrialmente, foram realizadas transfecções com diferentes concentrações de siRNAs (135ng, 162ng, 189ng, 216ng, 243ng e 270ng) por poço. Estes ensaios foram realizados com a finalidade de determinar qual concentração de siRNA alvo transfectado poderia indicar uma diminuição do efeito citopático do MHV-3 nas células L-929.

Os resultados obtidos estão demonstrados nas figuras 21 a 34.

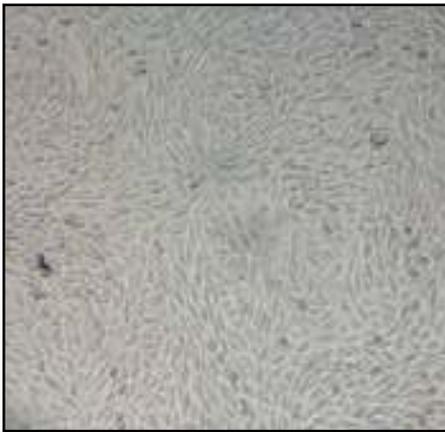


Figura 21. Células L-929. Células controle. Aumento 250x



Figura 22. Células L-929 infectadas com 1TCIF₅₀ do MHV-3. Aumento 250x

Concentração de siRNA na transfecção: 135ng



Figura 23. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante (*GFP*) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 24. Células L-929 transfectadas com o siRNA N e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Concentração de siRNA na transfecção: 162ng



Figura 25. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante (*GFP*) (162ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 26. Células L-929 transfectadas com o siRNA N (162ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Concentração de siRNA na transfecção: 189ng



Figura 27. Células L-929 transfectadas com o siRNA irrelevante (*GFP*) (189ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 28. Células L-929 transfectadas com siRNA N (189ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Concentração de siRNA na transfecção: 216ng



Figura 29. Células L-929 transfectadas com o siRNA GFP (216ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 30. Células L-929 transfectadas com o siRNA N (216ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Concentração de siRNA na transfecção: 243ng



Figura 31. Células L-929 transfetadas com o siRNA GFP (243ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 32. Células L-929 transfetadas com o siRNA N (243 ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Concentração de siRNA na transfecção: 270ng



Figura.33. Células L-929 transfetadas com o siRNA irrelevante (*GFP*) (270ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x



Figura 34. Células L-929 transfetadas com o siRNA N(270ng) e infectada com 1 TCID₅₀ do MHV-3 (24 hpi). Aumento 250x

Observando-se os resultados obtidos, pode-se notar a diminuição do efeito citopático do MHV-3 nas células transfectadas com os siRNA alvo para a proteína N . Este efeito inibitório foi observado a partir da concentração de 189 ng (Fig. 27, 29, 31 e 33). Nas células L-929 transfectadas com o siRNA GFP (irrelevante), a partir da concentração de 216 ng (Fig. 30, 32 e 34) também se observou uma diminuição do efeito citopático, ou seja, este siRNA experimental não específico induziu uma proteção viral inespecífica nas células infectadas por MHV-3.

4.2. Análises Moleculares

4.2.1 RT-PCR

Para confirmar os resultados obtidos pela microscopia óptica das culturas celulares transfectadas com os siRNAs sintéticos, analisamos a expressão gênica da proteína N nestes extratos celulares, através da técnica de RT-PCR .

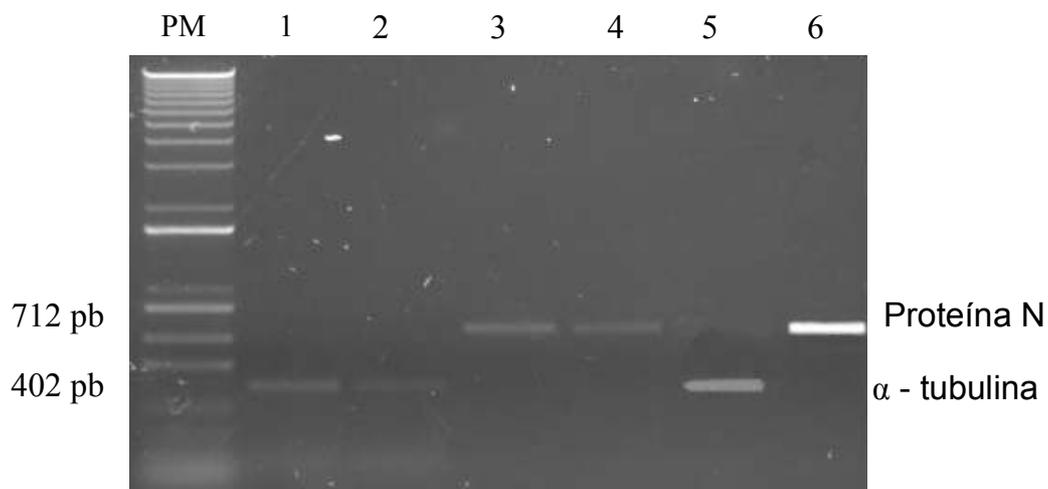


Fig. 35. Eletroforese em gel de agarose 1% . Produto amplificado de 2 diferentes tamanhos: 402pb (α -tubulina) e 712 pb (Proteína N), obtidos do sobrenadante de células L-929. PM: marcador de peso molecular. **Colunas 1 e 3:** células L-929 transfectadas com o siRNA GFP. **Colunas 2 e 4:** células L-929 transfectadas com o siRNA N. **Colunas 5 e 6:** células L-929 infectadas com o MHV-3.

Na figura 35 podemos observar uma possível diminuição da expressão gênica da proteína N nas células transfectadas com o siRNA N quando comparadas com a expressão no experimento controle das células L-929 infectadas com o MHV-3. Como na reação também observou-se uma diminuição da expressão no controle interno da reação (α - tubulina), foi realizada a técnica de PCR em Tempo Real para comprovar a inibição específica da replicação viral pelo siRNA N, uma vez que esta técnica se mostra mais sensível e específica para análise desses resultados.

4.2.2. PCR em tempo Real

Para avaliar o efeito da RNAi utilizando-se siRNAs alvos para a proteína N do MHV-3 foi realizada a técnica de PCR em Tempo Real. Esta metodologia quantitativa e altamente específica tem como objetivo quantificar a expressão de genes de interesse.

Na validação de amostras com diferentes concentrações de cDNA (Fig. 36), da região codificadora do gene da proteína N e do controle endógeno GAPD obteve-se uma eficiência de 1,1 (100%), resultado que pode ser observado nas retas obtidas nos gráficos da expressão da proteína N e do GAPD gerados com as concentrações logarítmicas das amostras x Ct (Fig. 37). As retas possuem uma inclinação parecida, validando os nossos resultados.

Neste trabalho utilizamos esta técnica com o intuito de obter resultados mais conclusivos relacionando a RNAi com o MHV-3. A análise quantitativa da expressão da proteína N do MHV-3 foi realizada em grupos controle (células L-929 infectadas com MHV-3), e nos grupos experimentais (células L-929 transfectadas com siRNA N e GFP) 24 horas após a infecção, utilizando-se o sistema *Taq-Man*.

Para esta análise foi usado como referência o grupo experimental, ou seja, a expressão gênica da proteína N dos grupos controles foi comparada com a expressão gênica da proteína N no grupo experimental.

Pode-se observar que no grupo controle (células L-929) não ocorreu expressão da proteína N, no grupo em que células foram apenas infectadas com MHV-3 ocorreu a expressão gênica da proteína N 107,67 vezes maior do que a expressão gênica observada no grupo experimental. Nas células transfectadas com o siRNA GFP ocorreu uma expressão gênica 1,24 vezes maior do que no grupo experimental (Fig.38).

Estes resultados obtidos por PCR em tempo Real confirmam os resultados observados na análise fenotípica onde siRNAs não específicos, induziram nas células L-929 uma proteção antiviral.

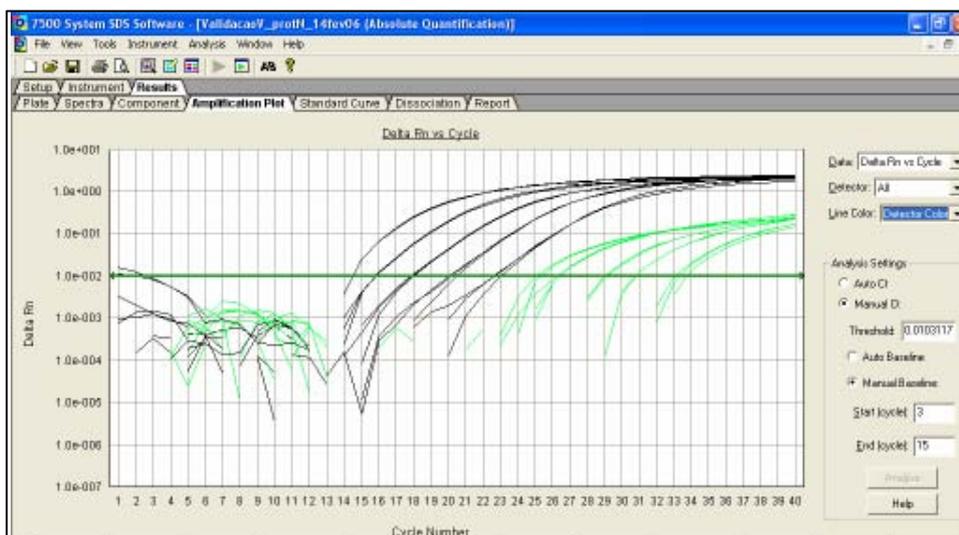


Fig.36. Curvas padrão utilizadas para o cálculo da eficiência das reações, validando os próximos experimentos. GAPD em preto e Proteína N em verde.

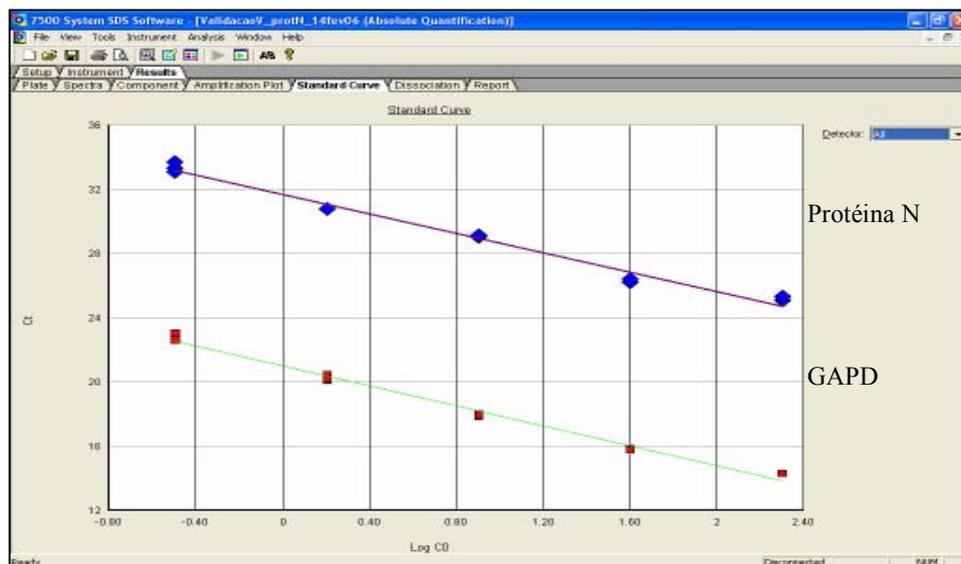


Fig.37. Gráfico gerado pelo programa “7500 System SDS Software” mostrando a cinética de amplificação em escala logarítmica do gene da proteína N e do controle endógeno GAPD com diferentes concentrações de cDNA

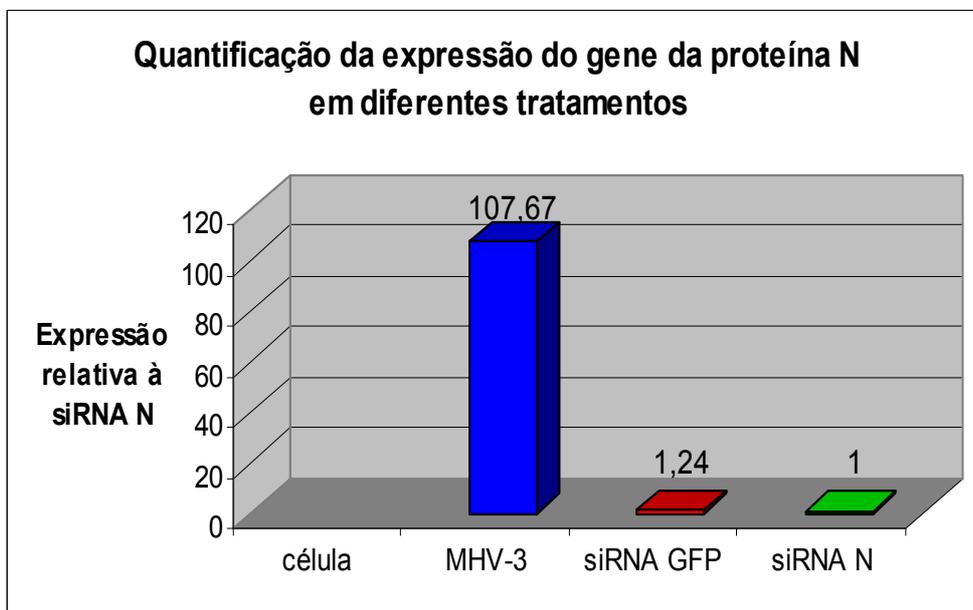


Fig.38. Expressão do gene da proteína N em diferentes tratamentos, utilizando como calibrador a amostra transfectada como os siRNA N. As avaliações foram feitas em triplicatas.

4.2.3. Western blot

A presença da proteína N nas amostras em estudo foi evidenciado por Western blot, sendo demonstrado que ocorreu uma redução da expressão da proteína N nos experimentos que utilizaram os siRNAs N e GFP (Fig. 39). Este resultado complementa e confirma a análise fenotípica e a análise molecular realizada por PCR em Tempo Real.

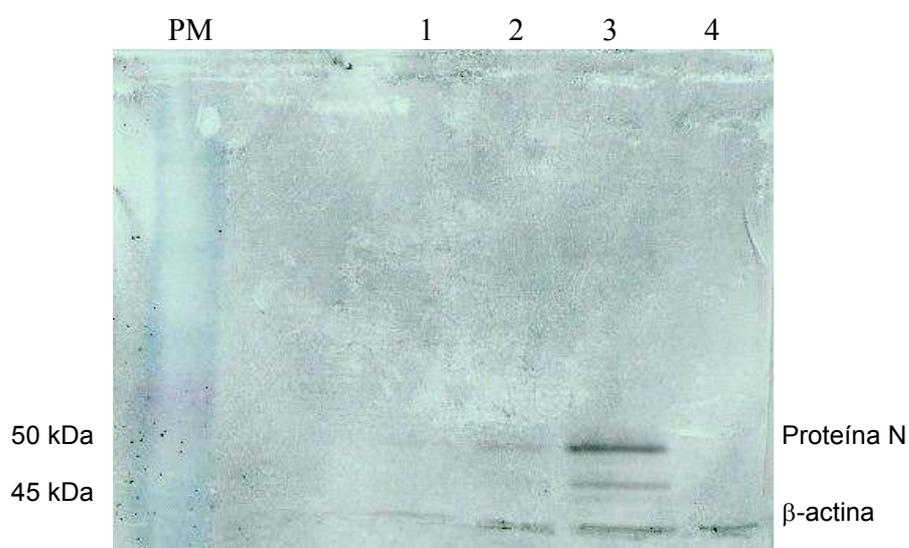


Figura 39. Análise da expressão da proteína N . Proteína N do MHV-3 (50 kDa). β -actina (controle interno) (45kDa). PM: marcador de peso molecular. Coluna 1: Células L-929 transfectadas como siRNA N. Coluna 2: Células L-929 transfectadas como siRNA GFP. Coluna 3: Controle células L-929 infectadas com MHV-3. Coluna 4: Controle células L-929.

V. DISCUSSÃO

Na última década, a técnica de Interferência por RNA (RNAi), mediada por moléculas de dupla fita de RNA pequenas (*small interfering molecules*) (siRNAs), tem sido aos poucos reconhecida como o maior mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) em diversos organismos como plantas, *Drosophila* e *C. elegans*. (Vaucheret *et al.*, 1998; Fire *et al.* 1998) É um processo altamente conservado, no qual a expressão ou introdução de moléculas de dupla-fita de RNA resulta em uma inativação específica pós-transcricional de genes, os quais possuem seqüências complementares às seqüências dos dsRNAs usados. (Hannon *et al.*, 2002)

Esta tecnologia tem sido aplicada em estudos funcionais gênicos, identificando papéis importantes de diversos genes. Pesquisadores do mundo inteiro têm utilizado a técnica de RNAi em pesquisas básicas e estão desenvolvendo novas drogas para a prevenção e tratamento de doenças humanas, como as infecções virais, tumores e desordens metabólicas. (Milhavet *et al.*, 2003)

A descoberta de um mecanismo celular altamente conservado que poderia regular a expressão gênica através da introdução de moléculas de dupla-fita de RNA instigou também os virologistas. Esta revolução prometia, e promete, trazer mais conhecimentos sobre interações hospedeiro-patógeno, assim como proporcionar um melhor entendimento dos mecanismos de replicação viral, e talvez seja a base para uma técnica terapêutica eficaz no tratamento de infecções virais (Saleh *et al.*, 2004)

Os siRNAs têm se mostrado efetivos no silenciamento de genes endógenos e de genes relacionados a vários vírus, como o vírus da dengue (Adelman *et al.*, 2002), os poliovírus (Gitlin *et al.*, 2002), o HIV (Jacque *et al.*, 2002; Novina *et al.*, 2002) e o vírus da hepatite C (Kapadia *et al.*, 2003). Atualmente, a tecnologia RNAi tem sido relatada como

uma ferramenta ideal para inibir o processo de replicação viral porque siRNAs específicos silenciam genes importantes em várias etapas deste processo (Colbere-Galpin *et al.*, 2005).

O laboratório de Genética Molecular /FCM/UNICAMP em 2003 começou a fazer uso desta nova técnica de silenciamento no estudo de vários genes, inclusive do MHV-3. O MHV-3, pertencente ao grupo II dos Coronavírus, é um vírus envelopado, possui um RNA de fita simples (+) no seu genoma. Replica-se no citoplasma de células infectadas e são conhecidos como os vírus mais comuns em biotérios nacionais e internacionais podendo interferir nos resultados das pesquisas científicas. (Gilioli *et al.*, 1996; Kagiya *et al.*, 1986)

Com a finalidade de verificar a eficiência da RNAi na infecção de células por MHV-3, escolhemos como alvo para o silenciamento a proteína N, do nucleocapsídeo viral imprescindível para a regulação da síntese de RNA viral.

Nos primeiros experimentos utilizando os siRNAs desenhados e sintetizados no laboratório de Genética Molecular/ FCM/ UNICAMP, pela análise fenotípica pudemos verificar a inibição da replicação do MHV-3 *in vitro*. As células L-929 transfetadas com os siRNAs alvos para a proteína N e infectadas com o MHV-3 apresentaram uma diminuição no número de sincícios quando comparadas com o controle de células infectadas. Esses resultados demonstraram que, possivelmente, os siRNA seriam eficientes no controle da infecção viral. Shi *et al.*, (2005) em experimentos com outro Coronavírus, o vírus da SARS, obtiveram resultados semelhantes com siRNAs que tinham como alvo vários genes, entre eles o da proteína N, comprovando que este último siRNA foi eficiente, suprimindo a expressão gênica do SARS em 70% (Qin *et al.*, 2004). O vírus da herpes aviário também teve sua replicação inibida por moléculas de siRNAs alvos para este vírus,

e foi observado um efeito inibitório em cultura de células de fibroblastos (Malanna *et al.*, 2006).

Porém, além desses resultados observamos nos primeiros ensaios realizados que siRNAs não seqüência específicos (irrelevantes), protegiam as células da infecção viral, sugerindo que esses siRNAs induziam a secreção de substâncias que protegiam as células da infecção por MHV-3.

Kim *et al.*, (2004) também relataram este fenômeno utilizando a técnica de RNAi no bloqueio da infecção pelo vírus HSV-1 e concluíram que siRNAs sintetizados por T7 RNA polimerase poderiam induzir uma potente indução de IFN α e β em várias linhagens celulares. A análise dos mediadores da resposta revelou que a porção 5' trifosfato, presente nas moléculas de siRNAs após a síntese por T7 RNA polimerase, era a indutora de IFN neste processo.

Desse modo, concluímos que o efeito antiviral observado em nossos experimentos poderia ser mediado por moléculas secretadas no meio celular, provavelmente IFNs. Com base nestes resultados, tratamos nossas moléculas (siRNAs) com CIAP, o qual retirou a porção 5' trifosfato das moléculas sintetizadas, observando-se um aumento na eficiência dos nossos siRNAs sintetizados no laboratório, isto é, siRNAs seqüência-específicos bloquearam a infecção viral, acompanhada de uma diminuição do efeito citopático e os siRNAs não específicos não bloquearam a infecção.

A indução de IFN, mediada por dsRNAs em células de mamíferos, é um mecanismo conhecido há muitos anos por cientistas, os quais constataram que a presença de moléculas de dsRNAs com mais de 30 nucleotídeos, induzem a uma resposta mediada por IFNs. Esta ativação ocorre devido ao fato de que dsRNAs ativam componentes importantes do

processo de ativação destas citocinas, como a proteína quinase R (PKR), a enzima 2'5'oligoadenilato sintetase e RNase L (Manche *et al.*, 1992; Minks *et al.*, 1979).

Elbashir *et al.*, (2001) demonstrou que siRNAs sintéticos de 21 nucleotídeos específicos, poderiam suprimir a expressão gênica em células de mamíferos sem produzir efeitos tóxicos. Esta descoberta, a princípio resolveria os problemas de inespecificidade da RNAi e indução de IFN. No entanto pesquisas mais recentes contestam muitos destes trabalhos. Sledz *et al.*,(2003) demonstraram que moléculas de siRNAs sintetizadas por T7 e também sintetizadas sinteticamente, induziam a produção de interferon pela via JAK-STAT e pela ativação da PKR. Kim *et al* (2004) comprovou o efeito de indução de interferon com siRNAs sintetizados por T7, mas não com siRNAs sintéticos.

Na análise fenotípica das células transfectadas com o siRNAs sintético tendo o mesmo alvo, a proteína N do MHV-3, observamos uma diminuição do efeito citopático, demonstrando possivelmente a eficiência do siRNA alvo na infecção do MHV-3. Mas nos experimentos controles, que utilizaram o siRNA GFP (irrelevante), foi observado efeito citopático, com poucos sincícios, o que não foi observado nas células infectadas apenas com o vírus. Estas observações mostraram que siRNAs sintéticos, não específicos produziam também um efeito antiviral .

Para confirmar os resultados obtidos com a análise fenotípica da inibição da replicação viral nas células L-929, realizamos ensaios moleculares. Com o objetivo de comprovar os resultados observados na técnica de RT-PCR e tentar quantificá-los utilizamos a técnica de PCR em Tempo Real, relatada como sendo altamente eficaz em estudos que têm como objetivo a quantificação da expressão gênica. Na avaliação do efeito de siRNAs na replicação do vírus SARS-CoV e de um herpesvírus, os autores destes trabalhos demonstram dados importantes relatando concentrações de diferentes genes em

diversos grupos experimentais e controles, utilizando esta técnica (Wang *et al.*, 2004; Malanna *et al.*, 2006).

Os ensaios realizados com a técnica de PCR em Tempo Real confirmam os dados obtidos durante a análise fenotípica. A quantificação da expressão da proteína N, mostrou uma redução de 107,67 vezes na quantidade de transcritos correspondentes nas células transfectadas com siRNA N em relação às células infectadas somente com MHV-3. No entanto também ocorreu uma diminuição significativa da expressão do gene da proteína N nos experimentos com o siRNA GFP sintéticos, provavelmente devido à inibição inespecífica descrita também em outros trabalhos (Persengiev *et al.*, 2004; Semizarov *et al.*, 2003)

Complementando nossa análise realizamos também a técnica de *Western blot* para análise da expressão proteica em nossos ensaios. Nestes ensaios também constatamos que ocorreu diminuição da expressão da proteína N nos experimentos que utilizaram o siRNA N e nos com siRNA GFP, sendo que uma menor expressão foi observada nas células com siRNAs N.

Observamos que siRNAs que foram sintetizados no laboratório ou sinteticamente, podem induzir uma resposta antiviral não específica. Kariko *et al.*, 2004, utilizando siRNAs em transfecções com diferentes linhagens celulares observaram que siRNAs de diferentes seqüências produzia efeitos não específicos nos ensaios. Estes efeitos ocorriam devido a ativação de moléculas do sistema imune, como interferons. Estes autores relatam que siRNAs, além de ativar componentes do sistema imune, também aumentavam a expressão de um receptor celular (TRL3) que potencializaria a ativação da produção de IFNs.

Além dos efeitos descritos anteriormente, devemos considerar que fatores como tipos de linhagens celulares utilizadas nas transfecções e densidade do crescimento da monocamada celular devem ser considerados em trabalhos que utilizam a técnica de RNAi. (Medema *et al.*, 2004).

siRNAs representam uma ferramenta promissora para o estudo do silenciamento gênico viral. No entanto, devido à possibilidade da ocorrência desses efeitos inibidores não-específicos que podem interferir na especificidade e eficiência desta nova técnica, se faz necessário o uso de controles mais rigorosos.

No estudo com coronavírus como o MHV-3, também devemos considerar a possibilidade de ocorrência de efeito não específico, mediado por moléculas de RNA dupla fita produzidas durante a replicação viral, além daqueles observados com siRNAs.

VI. CONCLUSÕES

Com os presentes resultados podemos concluir que:

1. Observou-se diferença quanto à eficiência das moléculas interferentes sintetizadas *in vitro*, uma vez que na análise fenotípica foi observado que o siRNA 634 após tratamento com CIAP foi mais eficaz na inibição da ocorrência do efeito citopático causado pelo MHV-3;
2. A técnica RNAi tendo como alvo a proteína N do MHV-3, empregando-se siRNAs sintéticos ou tratados com CIAP foi eficiente e específica contra a infecção viral, observado através da análise fenotípica e molecular;
3. siRNAs sintetizados pela transcrição *in vitro* desencadeiam uma resposta antiviral não específica, mediada por moléculas secretadas no meio celular, provavelmente interferons. O tratamento com CIAP inibiu a ocorrência desse efeito inespecífico das moléculas sintetizadas por T7 polimerase. Efeito este também observado com moléculas sintéticas;
4. Experimentos que utilizam a técnica de RNAi contra alvos virais devem ser cuidadosamente controlados e monitorados contra possíveis efeitos não específicos desencadeados por moléculas de dsRNA;
5. Um efeito inespecífico foi observado relacionado com o aumento da concentração de siRNA irrelevante GFP.

VII.BIBLIOGRAFIA

- Adelman, Z. N., Sanchez-Vargas, I., Travanty, E. A., Carlson, J. O., Beaty, B.J., Balir, C. D., Olson, K.E., 2002. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in trasformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted repeat RNA derived from the virus genome. **J. Virol.** **76**: 12925-12933.
- Barthold, S.W., Smith, A. L., 1984. Mouse hepatitis virus strain-related patterns of tissue tropism in suckling mice. **Arch.Virol.** **81**: 103-112.
- Barthold, S.W., Smith, A.L., 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus JHM following intranasal inoculation of mice. **Archives of Virol.** **122**: 35-44.
- Bass, B. L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. **Cell.** **101**: 235–238.
- Bernstein, E., Caudy, A.A, Hamond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role of bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**: **409**. 363-366
- Bond, C.W., Leibowitz, J.L., Robb, J.A., 1979. Pathogenic mouse coronaviruses. II. Characterization of virus-specific proteins of mouse coronaviruses: MHV- JHM and MHV-A59. **Virology.** **94**: 371-384.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 197-201.
- Britko, V., Barik, S., 2001. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double– stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. **B.M.C. Micobiol.** **1**: 1-34.

- Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., Morgan, R.A, 2000. dsRNA- mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. **Gene.** **252**:95-105.
- Chiu, Y.L., Rana, T.M., 2002. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interferingRNA. **Mol. Cell.** **10**: 549- 561.
- Colbere-Garapin, F., Blondel, B., Saulnier, A., Pelletier, I., 2005. Silencing viruses by RNA interference. **Microbes Infect.****7**: 767-775.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Balcombr, D. C., 2000. An RNA dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is requires for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell.** **101**: 543-553.
- de Lang, P., Van Blokland, R., Kooter, J. M., Mol, J.N., 1995. Suppression of flavonoid flower pigmentation genes in *Petunia hybrida* by the introduction of antisense and sense genes. **Curr.Top. Microbiol. Immunol.** **197**: 57–75.
- Donze, O., Picard D., 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. **Nucl. Acids Res.** **30**: 46.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendechel, W., Yalcin, A., Webwe, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21- nucleotide RNAs mediate RNA interference in culture mammalian cells. **Nature.** **411**: 494-498.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kosta, S.A., Driver,S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** **391**: 806-811.
- Fischer, L.T., Yin, J. Q., 2004. A new therapeutic strategy against viral infection. **Cell Research.****146**: 460- 466.

- Ge, Q., McManus, M.T., Nguyen, T., Shen, C.H., Sharp P.A., Eisen, H.N., Chin, J., 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **100**: 2718-2723.
- Gilioli, R., Sakurada, J.K., Andrade, L., Rangel, H.A., 1996. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Lab. Anim. Sci.** **46**: 582-584
- Gitlin, S., Karelsky, S., Andino, R., 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. **418**: 430-434.
- Gledhill, A., Andrewes, C.H., 1951. A hepatitis virus of mice. Brazilian. **J. Exp. Pathol.** **32**: 559-568.
- Hannon, G.J. , 2002 .RNA interference. **Nature**. **418**:244-251.
- Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., Weber, K., 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. **J. Cell Science.** **114**: 4557–4565.
- Hiscox, JA., Wurm,T., Wilson, L., Britton, P., Canagh, D., Brooks, G., 2001. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. **J. Virol** .**75**: 506-512
- Holmes, K.V.,2001. Coronaviruses-The viruses and their replication. pp1163-1185. In: Fields, B.N., Knipe, D. M., Howley, P.M (eds), **Fields Virology**, Vol. 1. 4thed. Lippincott-Raven Publishers, New York.
- Jacque, J.M., Triques, K., Stevenson, M., 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. **Nature**. **418**:435- 438.

- Kagiyama N, Takakura A, Itoh T., 1986. A serological survey on 15 murine pathogens in mice and rats. **Exp. Anim. Science.** **35**: 531-536.
- Kapadia, S.B., Brideau-Andersen, A., Chisari, F.V., 2003. Interference of Hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **100**: 2014-2018.
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., Weissman, D., 2004. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. **J. Immunol.** **172**: 6545-6549.
- Karpala, A.J., Doran, T.J., Bean, A.G; 2005. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. **Immunol Cell Biol.** **83**: 211-216.
- Kennerdell, J.R., Carthew, R.W., 1998. Use of dsRNAs –mediated genetic interference to demonstrated that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. **Cell.** **95**: 1017-1026.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell.** **115**: 209-216.
- Kim. D.H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E, Rossi. J.J., 2004. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. **Nat. Biotechnol.** **22**: 321-325.
- Konishi, M., Wu, C.H., Wu, G.Y., 2003. Inhibition of HBV replication by siRNAs in a stable HBV-producing cell-line. **Hepatology.** **38**: 842-850.
- Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J, Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., Anderson LJ;. 2003. A

- novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **N. Engl. J Med.** **348**: 1953-1966.
- Kuo, L., Godeke, G.J., Raamsman, M.J., Masters, P.S., Rottier, P.J., 2000. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. **J. Virol.** **74**: 1393–1406.
- Kuo, L., Masters, P.S., 2002. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. **J. Virol.** **76**: 4987-4999.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lai, M.M.C., Holmes, K.V: Coronaviridae: The viruses and their replication. **In: Fields Virology**. Knipe D. Howley P (Eds). Lippicott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA 2001): 1163-1185.
- Lavi, E., Gildea D.H., Highkin, M.K., Weiss, S.R. 1986. The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation. **Lab. Anim. Science.** **36**: 130-135.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2002. RNAi targeting an animal virus: news from the front. **Mol. Cell.** **9**: 925–957.
- Luytjes, W., Bredenbeek, A.F., Noten, A.F., 1988. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA2: indications for recombination between coronaviruses and Influenza C virus. **Virology.** **166**: 415-422.
- Mallanna, S.K., Rasool, T.J., Sahay, B., Aleyas, A.G., Ram, H., Mondal, B., Nautiyal, B., Premraj, A., Sreekumar, E., Yadav, M.P., 2006. Inhibition of Anatid Herpes Virus-1

- replication by small interfering RNAs in cell culture system. **Virus Research**. **115**: 192-197.
- Manche,L., Green, S.R., Mathews, M.B., 1992. Interactions between double stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. **Mol. Cell. Biol.** **12**: 5238-5248.
- Marathe, R., Anandalaksmi, R., Smith, T.H., Pruss, G.J., Vanca, V.B., 2000. RNA viruses as inducers, suppressors and targets as post-transcriptional gene silencing. **Plant. Mol. Biol.** **43**: 295-306.
- Matzke, M., Matzke, A.J., Kooter, J.M., 2001 RNA: guiding gene silencing. **Science**. **293**: 1080-1083.
- Medema, R.H., 2004. Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. **Biochem. J.** **380**: 593-603.
- Milhavet, O., Gary, D.S., Matson, M.P., 2003. RNA interference in Biology and Medicine. **Pharmacol. Review.** **55**: 629-648.
- Minks, M.A., West, D.K., Benveniste, S., Baglioni, C., 1979. Structural requirements of double stranded RNA for the activation of 2'5'-oligo (A) polymerase and protein kinase of interferon related HeLa cells. **J. Biol. Chem.** **254**: 10180-10183.
- Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo. T.A., Vaucheret, H., 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural viral resistance. **Cell**. **101**: 533-542.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., Utlie, E., 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **95**: 14687-14692.

- Novina, C.D., Murray, M.F., Dykxhoorn, D.M., Beresford P.J., Riess, J., Lee, S.K., Collman, R.G., Lieberman. J., Shankar, P., Sharp, P.A.,2002. siRNA- directed inhibition of HIV-1 infection. **Nat. Med.** **8**: 681-686.
- Plasterk, R.H., 2002. RNA silencing: the genome's immune system. **Science**.**296**: 1263-1265.
- Persengiev, S.P., Zhu, X., Green, M. R., 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). **RNA**. **10** : 12-18.
- Qin Z., Zhao P. ,Zhang X., Yu J., Cao, M.M., Zhao, L.J., Luan, J., Qi Z.T., 2004 . Silencing of SARS-CoV spike gene by small interfering RNA in HEK 293T cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. **324**: 1186–1193.
- Randall, G., Grakoui, A., Rice,C. M., 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **100**: 235-240.
- Reed, L.J & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. **American J. Hyg.** **27**:493-497.
- Rota, P.A., Oberste, S.S., Monroe, S.S., 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science**. **300**: 1394-1399.
- Saleh, Van Rij, R.P., Andino, R.2004. RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. **Virus Research**. **102**:11- 17.
- Schwars, D.S; Hutvagner, G; Du, T; Xu, Z; Aronin, N; Zamore P.D., 2003. Assimetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**. **115**: 199-208.

- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N., Fesik, S. W., 2003. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. **PNAS** **11**: 6347-6352.
- Shi, Y; Yang, D.H; Xiong, J., 2005. Inhibition of genes expression of SARS coronavirus by synthetic small interfering RNAs. **Cell Research** **15**: 193-200.
- Sidell, S.G; Wege, H; Ter meulen, V., 1982. The structure and replication of coronaviruses. **Curr. Top. Microb. Immunol.** **99**: 131-136.
- Sidell, S.G., 1995. The coronaviridae. Plenum Press, New York.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J, Silverman, R.H., Williams, B.R., 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. **Nat. Cell Biol.** **5**: 771-772.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, J.C., Dobbe, J.C., 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. **J. Mol. Biol.** **331**: 991-1004.
- Spaan, W., Cavanagh, D., Horzenek, M.C., 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. **J. Gen. Virol.** **69**:2939-2952.
- Surabhi, R.M., Gaynor, R.B., 2002. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. **J. Virol** **76**: 12963–12973.
- Taguchi, F., Makino, S., Fujiwara, K., 1982. Antigenic differentiation of mouse hepatitis viruses by neutralization. **Microbiol. Immunol.** **26**: 741-745.
- Tyrrel, T.A., Almedia, J.J.D., Berry, D.M., 1968. Coronavirus. **Nature.** **220**: 650.

- Vaucheret, H., Beclin, C., Elamy, F., Feurbach, C., Godon, J.B., Morel, P., Vernhettes, 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant. J.** **16**: 651-659.
- Wang, Z., Ren, L., Zhao, X., Hung, T., Meng, A., Wang, J., Chen, Y., 2004. Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. **J. Virol.** **78(14)**: 7523-7527.
- Wianny, F., Zernicka-Goetz, M., 2000. Specific interference with gene function by dsRNA in early mouse development. **Nat. Cell Biol.** **2**: 70-75.
- Yin, J.Q., Wan, Y., 2002. siRNA – mediated gene regulation system. **Science.** **10**: 355-365.
- Yu, J., DeRubeis, S.C., Turner, D.L., 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **30**: 6047-6052.
- Zamore, P. D., Tuschli, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P. 2000. RNAi: double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell.** **101**: 25-33.
- Zhang, Y., Li, T., Fu, L., Yu, V., Li, Y., Xu, X., Wang, Y., Ning, H., Zhang, S., Chen, W., Babiuk, L.A., Chang, Z., 2004. Silencing SARS-CoV Spike Protein expression in cultured cells by RNA Interference. **FEBS letters.** **56**

VIII. ANEXOS

5' triphosphate of *in vitro* transcribed small interfering RNA molecules (siRNAs) induce antiviral response

Mariângela C. Grippo¹, Tiago Campos-Pereira¹, Vinícius D.B. Pascoal¹, Patrícia A. R. Aguiar¹, Rovilson Gilioli² and Iscia Lopes-Cendes¹

1. Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences; 2. Laboratory of Animal Quality Control – Multidisciplinary Center of Biology Investigation -CEMIB; University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, BRAZIL

KEY WORDS: MHV-3, RNA interference, L929 cells, interferon, protein N.

Corresponding author:

Ischia Lopes-Cendes, M.D., Ph.D.
Department of Medical Genetics
University of Campinas-UNICAMP
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas, SP, Brazil, 13084-971
Tel: +55 19 37888907
FAX: +55 19 37888909
E-MAIL: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) can be applied as a technique for specific and potent gene silencing by double stranded RNA molecules (dsRNAs). In this study we used double stranded RNA molecules against hepatitis murine virus type 3 (MHV-3) in L929. We identified that small interfering RNA molecules (siRNAs) produced by *in vitro* transcription triggered a potent and sequence-inespecific antiviral response. In addition, we demonstrated that this antiviral effect was mediated through molecules that were secreted in medium culture, probably interferons. Further treatment with phosphatase eliminated the antiviral effect, thus implicating the 5' triphosphate in triggering the observed antiviral response. Therefore, our data shows that although cost-effective and efficient, *in vitro* transcribed siRNAs must be dephosphorylated before *in vitro* use to avoid unexpected experimental interference.

1. INTRODUCTION

RNA interference (RNAi) is an innate cellular process, which is activated by a double-stranded RNA molecule with 19-23-nucleotide duplexes, and it has been demonstrated in cells from *Caenorhabditis elegans* to mammals (Fire *et al.* 1999; Agami *et al.* 2002; Elbashir *et al.* 2001). RNAi is triggered by degradation of single –stranded RNAs of identical sequences. Therefore, RNAi can be used as a technique to silence gene expression by directly targeting its specific sequence of mRNA. Beside the widely used strategies for knocking down gene expression in academic research, RNAi technology, generated by small interfering RNAi (siRNA), has been used in therapeutic studies of human diseases including cancer, neurodegenerative diseases and viral infections diseases (Shi *et al.* 2003; Ge *et al.* 2003). To date, RNAi technology is reported as an ideal tool to inhibit infectious virus replication in host cells because siRNA can target and silence the important genes of the virus (Gitlin *et al.* 2002., Tan *et al.* 2004).

Mouse hepatitis virus (MHV), belongs to the coronavirus family, is an enveloped single stranded plus- sense RNA virus with a genome about 30 kb. The MHV genome encodes many proteins: nucleocapsid protein (N), spike (S), membrane (M) and some contain HE glycoprotein. (Compton *et al.* 1993). MHV primarily infects the respiratory system or the gastrointestinal tract, and is a major cause of morbidity and mortality in experimental animal facilities around the world (Casebolt *et al.* 1988; Gilioli, *et al.* 1996). In the present study we aimed to investigate the effects of double stranded siRNA molecules produced by *in vitro* transcription through T7 RNA polymerase, in cultured cells infected with MHV-3.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 siRNAs design and synthesis

Targets for RNAi in the MHV genome (GenBank AF 201929) were designed using an algorithm developed in our laboratory (Campos-Pereira 2005). We excluded sequences similar to host-cells genes using the program Blast “search for short nearly exact matches”. We chose two siRNAs against the nucleocapsid protein (N), which were named 634 and 910, based on the position in the coding sequence. In addition, we synthesized irrelevant siRNA molecules (siRNA against HCPRTase from *S mansoni* (enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) and human ERAF (erythroid differentiation-related factor), unrelated to the viral sequence, to be used as an negative control. These siRNAs were used in other experiments in our laboratory.

Each 40-mer oligonucleotide was submitted to *in vitro* transcription as previously described (Donze and Picard 2002). Sequences for the *in vitro* transcription experiments are presented below:

Template 634s:

5' GCG CTA GAA GCA GTT CCA ACC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 634as:

5' CTG GTT GGA ACT GCT TCT AGC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 910s:

5' GTG ATC CGC AGT TCC CCA TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template 910as:

5' AAG AAT GGG GAA CTG CGG ATC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template irrelevant siRNA 1 (Human ERAF):

5' AGG AAG TCC CTG TAC TTG GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template irrelevant siRNA 2 (Human ERAF):

5' CTG GCC AAG TAC AGG GAC TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template irrelevant siRNA 3 (Rat ECA):

5' GCG TAT TCG TTC CAC AAC ACC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template irrelevant siRNA 4 (Rat ECA):

5' AAG GTG TTG TGG AAC GAA TAC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template irrelevant siRNA 5 (S mansoni HGPRTase):

5' AAG CAT AGC CAA CGA CAA ATC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template irrelevant siRNA 6 (S mansoni HGPRTase):

5' TCG ATT TGT CGT TGG CTA TGC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

2.2 Cell culture, transfection and infection with MHV-3

L929 cells were cultured in MEM-Eagle, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin. Subsequently, 1×10^4 cells were placed onto 24 well plates and grown at 37°C with 5% CO₂ overnight. Transfection was performed at 40% of cell confluence with a total of 20 picomoles of siRNA per well using Lipofectamine 2000 (Invitrogen™). After 24 h incubation, cells were infected with 1TCID₅₀ of MHV-3. Cell cultures were then observed, from 24 to 48 h, for the presence of cytopathic effects (lysis of cell layer and formation of syncytia). All experiments were performed in triplicates.

2.3 Medium change

Twenty four hours after siRNA transfection, medium culture was collected and transferred to untreated cells placed onto 24 well plates. After 24 h cells were infected with 1TCID₅₀ of MHV-3 and observed from 24 to 48 hours latter for the presence of cytopathic effects.

2.4 siRNA treatment with alkaline phosphatase

siRNAs were dephosphorilated using Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP, Promega™) according to the manufacturer's protocol.

3. RESULTS AND DISCUSSION

We observed marked morphologic change with clear-cut cytopathic effects in cell cultures infected with MHV-3 when compared to uninfected cells (fig. 1). When cell cultures were pre-transfected with both siRNA molecules (634 and 910) and then infected with MHV-3 we observed a significant decrease in the cytopathic effects, pointing to inhibition of viral replication (fig. 2 and fig. 3). However, when irrelevant control siRNA molecules were used in the pre-transfection experiments the same antiviral effect was observed for the three irrelevant control molecules (fig. 4, siRNA against HCPRTase from *S manson* and human ERAF), thus excluding the possibility that our irrelevant siRNA was acting as a off-targeting sequencing against a related host gene. Our results clearly showed that the antiviral effect obtained with the three irrelevant siRNA molecules was not due to RNA cleavage, since this is a sequence-specific process. Rather, some other element in our experiment was inducing a potent antiviral sequence-unspecific response. To test this hypothesis, we collected media culture from siRNAs-treated cells 24hs after transfection and placed on untreated cell cultures. After 24 h these cells were infected with 1TCID₅₀ of MHV-3. As suspected, this procedure protected the cells from the viral challenge, suggesting a role of a secreted molecule in the medium as the mediator of the antiviral effect.

A previous observation by Kim *et al.*, 2004 that T7 synthesized RNAs can lead to interferon induction due to the presence of 5' triphosphate lead us to test if such element was responsible for the unspecific antiviral effect obtained in our experiments. siRNAs were pre-treated with alkaline phosphatase prior to the transfection experiments. Pre-treated irrelevant siRNA molecules did not protect cell cultures from viral damage (fig.5). Only pre-treated sequence specific siRNA molecules (against protein N, 634 and 910) showed antiviral effect (fig. 6 and 7). These results demonstrate that the sequence-unspecific antiviral effect was probably due

to a previously unidentified interferon induction effect present in the 5' triphosphate, which was efficiently eliminated by pre-treated with alkaline phosphatase.

We conclude that, although simple and cost-effective, T7 synthesized RNA molecules should always be dephosphorylated before experimental use, to avoid inespecific findings resulting from the possibility of interferon induction pathways.

4. ACKNOWLEDGMENTS

We thank D.M.Rodrigues for help and technical assistance. This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). MCG was the recipient of a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

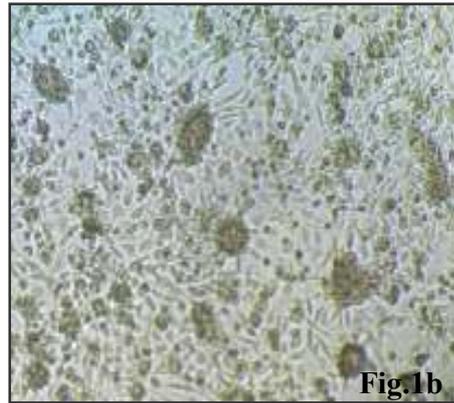
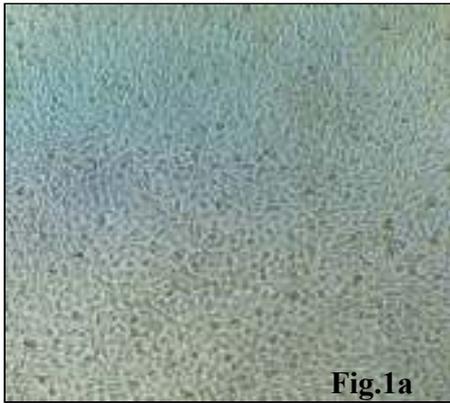


Fig. 1. Uninfected L929 cells (a) . L929 cells infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (b). 250x

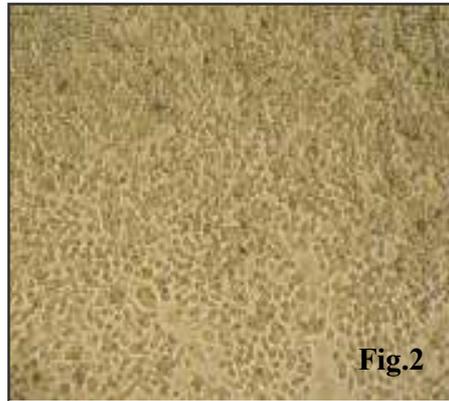


Fig.2

Fig. 2 L929 cells transfected with siRNA 634 without treatment with CIAP and infected with 1 TCID₅₀ of MHV-3 (24 hpi). 250x



Fig. 3 L929 cells transfected with siRNA 910 without treatment with CIAP and infected with 1 TCID₅₀ of MHV-3 (24 hpi). 250x

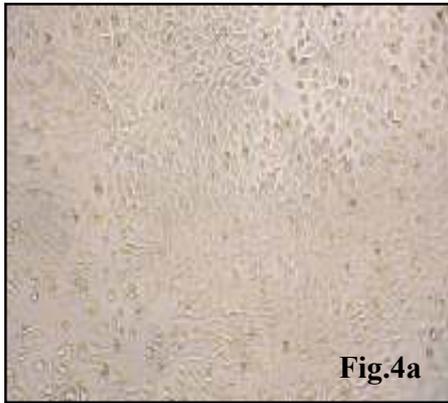


Fig.4. L929cells transfected with irrelevant siRNA (*S mansoni* HGPRTase) without treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (a). L929 cells transfected with irrelevant siRNA Eraf without treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (b). 250x

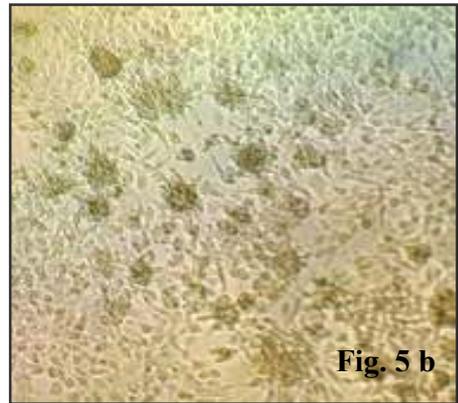
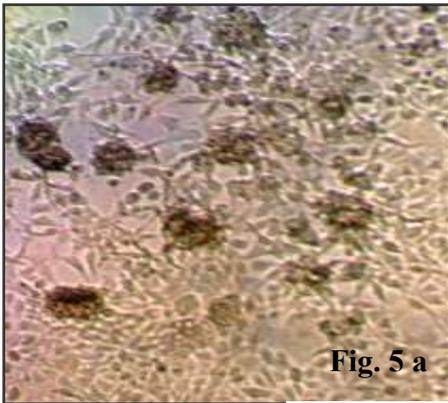


Fig. 5 L929 cells transfected with irrelevant siRNA (*S mansoni* HGPRase) after treatment with CIAP and infected with e1 TCID 50 of MHV-3 (a)(24 hpi). L929 cells transfected with irrelevant siRNA Eraf after treatment with CIAP and infected with e 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi). (b) 250x.



Fig. 6 L929 cells transfected with siRNA 634 after treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi). 250x

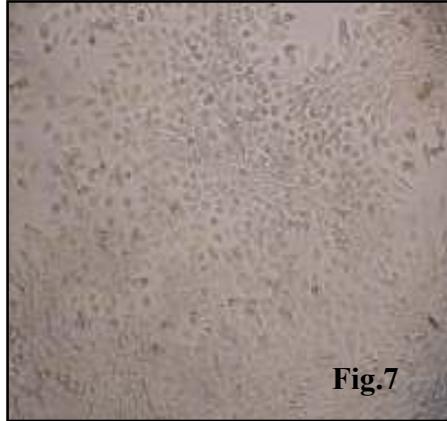


Fig. 7 L929 cells transfected with siRNA 910 after treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi). 250x

Legends of figures:

Fig. 1. Uninfected L929 cells(**a**). L929 cells infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (**b**).
250x

Fig. 2. L929 cells transfected with siRNA 634 without treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi). 250x

Fig. 3. L929 cells transfected with siRNA 910 without treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi). 250x

Fig.4. L929cells transfected with irrelevant siRNA (*S mansoni* HGPRTase) without treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (**a**). L929 cells transfected with irrelevant siRNA Eraf without treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (**b**). 250x

Fig.5. L929 cells transfected with irrelevant siRNA (*S mansoni* HGPRTase) after treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (**a**) (24 hpi). L929 cells transfected with irrelevant siRNA Eraf after treatment with CIAP and infected with 1 TCID 50 of MHV-3 (24 hpi) (**b**). 250x.

Fig.6.L929 cells transfected with siRNA 634 after treatment with CIAP and infected with 1 TCID₅₀ of MHV-3 (24 hpi). 250x

Fig. 7.L929 cells transfected with siRNA 910 after treatment with CIAP and infected with 1 TCID₅₀ of MHV-3 (24 hpi). 250x

5. REFERENCES

- Agami R (2002) RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr. Opin. Cem. Biol* 6: 829-834.
- Campos-Pereira T(2005).Estudo de possíveis aplicações médicas da interferência por RNA. PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. SP
- Casebolt DB,Lindsey JR and Cassell GH (1988) Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. *Lab. Animal Science*. 38: 327-329.
- Compton SR, Barthold SW and Smith A L (1993) The cellular and molecular pathogenesis of Coronavirus. *Lab. Animal Science*. 43: 15-26.
- Donze O and D. Picard (2002) RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 30:46.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendechel W, Yalcin A, Webwe K and Tuschl T (2001) Duplexes of 21- nucleotide RNAs mediate RNA interference in culture mammalian cells. *Nature*. 411: 494-498.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, *et al* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.
- Ge Q, McManus MT,Nguyen T, Shen CH, Sharp PA *et al* (2003) RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2718-23.
- Gilioli, R, Sakurada JK, Andrade L and Rangel HA (1996) Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab. Anim. Sci*. 46: 582-586
- Gitlin S, Karelsky S and Andino R (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. 418(6896):430-434.

- Kapadia S.B, Brideau-Andersen A and Chisari FV (2003) Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2014-218.
- McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH *et al* (2003) Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*. In press.
- Shi Y (2003) Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet*. 19:9-12.
- Tan FL and Yin JQ (2004) RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Research*. 14 (6): 460-466.