

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**AMANDA SOARES SANTOS**

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÁCIDO OLEANÔNICO NA REPLICAÇÃO DO  
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV).**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2018**

Amanda Soares Santos

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÁCIDO OLEANONICO NA REPLICAÇÃO DO  
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina na Universidade  
Federal de Uberlândia.

Orientador(a): Profa. Dra Ana Carolina Gomes  
Jardim

UBERLÂNDIA – MG

2018

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÁCIDO OLEANÔNICO NA REPLICAÇÃO DO  
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina na Universidade  
Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 30 de novembro de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

---

Dra. Jamile de Oliveira Pascoal

---

Msc. Heber Silva Leão

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus por ter me abençoado em toda a caminhada e ter permitido que eu chegasse até aqui.*

*Agradeço aos meus pais por todo o incentivo e apoio durante toda minha vida, ao meu irmão, Judson por todas as risadas e calma que me trouxe em momentos difíceis.*

*Agradeço ao meu namorado, Maikon por toda a paciência, carinho e compreensão que tem por mim.*

*Agradeço à minha orientadora Carol, por todo ensinamento, paciência, oportunidades e por ter acreditado em mim.*

*Agradeço à Suely pela co-orientação por cada ajuda, ensinamento e disposição por compartilhar seus conhecimentos.*

*Agradeço aos meus amigos do Team Nilo, por toda a ajuda, gargalhada, companheirismo e por cada pipeta lavada durante meus ensaios de resistência.*

*Agradeço ao Grupinho Fechado por me estar comigo durante toda a graduação, vivendo junto todos os pesadelos e emoções.*

*Agradeço também a todas as pessoas que fizeram parte da minha trajetória até aqui e que me ajudaram de qualquer forma.*

## RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) é o principal causador de doenças hepáticas e transplante de fígado no mundo. Atualmente, o tratamento é baseado em antivirais de ação direta (DAAs) em monoterapia, combinados ou associados à Interferon e Ribavirina, mas apresenta alto custo para a saúde pública. Por ser um vírus de RNA, apresenta altas taxas de mutações em seu genoma, levando ao aparecimento de variantes resistentes ao tratamento atual. O trabalho teve como objetivo avaliar efeitos do tratamento prolongado com o composto natural Ácido oleanônico (Ac.O), na replicação do HCV *in vitro*. Células Huh7.5 que expressam continuamente o replicon subgenômico (SGRluc-FEO), foram cultivadas na presença do composto Ac.O, depois ensaios foram realizados para determinação das concentrações efetiva. Posteriormente, ensaios de tratamento prolongado foram iniciados, com o objetivo de avaliar a ação deste composto ao longo do tempo. Após tratamento por períodos específicos, as células foram coletadas, lisadas e submetidas à leitura da replicação por luminescência. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com o composto Ac.O apresentou atividade antiviral significativa inibindo 57% da replicação. O ensaio de longo prazo mostrou a diminuição da replicação do HCV nos primeiros dias de tratamento, e nos dias seguintes um aumento gradual. A partir dos resultados obtidos o Ac.O pode ter selecionando uma população com mutação que caracterizou resistência ao tratamento.

Palavras-chave: HCV, antivirais, resistência e composto natural.

## ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is currently the worldwide main cause of liver disease and liver transplantation. The treatment is based on direct-acting antivirals (DAAs), monotherapy, combined or associated with Interferon and Ribavirin, but it has a high cost to public health system. Because it is an RNA virus, it has high mutation rates in its genome, leading to the appearance of resistant variants to the currently treatment. This work aimed to study the effects of prolonged treatment with the natural compound Oleanonic acid (AcO), in the replication of HCV *in vitro*. Huh7.5 cells expressing the subgenomic replicon (SGRluc-FEO) were cultured in the presence and absence of AcO, then assays were performed to determine the effective concentrations of viral replication. Subsequently, prolonged treatment trials were started, with the objective to evaluate the action of this compound over the time. After treatment for specific periods, the cells were collected, lysed and subjected to the replication reading by luminescence. The results showed that the treatment with compound AcO showed significant antiviral activity inhibiting 57% of replication. the long-term trial showed decreased HCV replication in the first days of treatment, and on the following days a gradual increase. From the results obtained the AcO may have generated a possible mutation that characterized resistance to the treatment.

Palavras Chave: HCV, antivirals, resistance, natural compound.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Prevalência mundial de indivíduos infectados pelo HCV..... | 9  |
| <b>Figura 2:</b> Ilustração da partícula e poliproteína viral do HCV.....   | 11 |
| <b>Figura 3:</b> Esquema do ciclo replicativo do HCV.....                   | 12 |
| <b>Figura 4:</b> Replicon subgenômico.....                                  | 17 |
| <b>Figura 5:</b> Viabilidade celular.....                                   | 20 |
| <b>Figura 6:</b> Atividade do composto Ac.O na replicação do HCV.....       | 21 |
| <b>Figura 7:</b> Concentrações efetivas de inibição.....                    | 22 |
| <b>Figura 8:</b> Tratamento em longo prazo na concentração de EC50.....     | 23 |
| <b>Figura 9:</b> Panorama geral do tratamento na concentração de EC50.....  | 24 |
| <b>Figura 10:</b> Tratamento em longo prazo na concentração de EC80.....    | 25 |
| <b>Figura 11:</b> Panorama geral do tratamento na concentração de EC80..... | 26 |

## SUMÁRIO

### Sumário

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introdução.....                                              | 8   |
| 1.1.    Hepatite C.....                                         | 8   |
| 1.2.    O vírus da Hepatite C.....                              | 9   |
| 1.3.    Tratamento.....                                         | 13  |
| 1.4.    Compostos Naturais.....                                 | 155 |
| 2. Objetivos .....                                              | 16  |
| 2.1    Objetivo Geral.....                                      | 16  |
| 3. Metodologia .....                                            | 17  |
| 3.1    Composto.....                                            | 17  |
| 3.2    Cultura de Células .....                                 | 17  |
| 3.3    Ensaio de Replicação.....                                | 18  |
| 3.4    Ensaio de EC50 e EC80.....                               | 18  |
| 3.5    Tratamento prolongado das células com composto Ac.O..... | 19  |
| 3.6    Análise estatística .....                                | 19  |
| 4. Resultados.....                                              | 20  |
| 4.1    Análise de viabilidade celular do Ac.O.....              | 20  |
| 4.2    Análise da atividade antiviral do Ac.O.....              | 21  |
| 4.3    Tratamentos de longo Prazo .....                         | 22  |
| 5. Discussão.....                                               | 27  |
| 6. Referencias .....                                            | 30  |

## **1. Introdução**

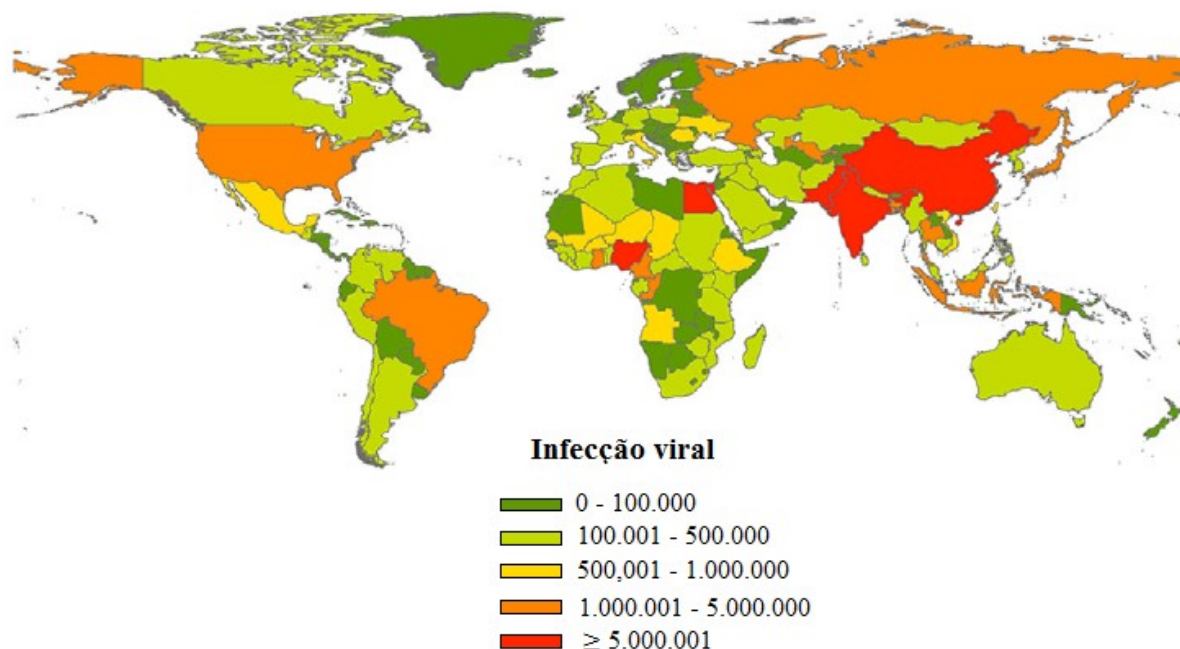
### **1.1. Hepatite C**

O vírus da Hepatite C (HCV) foi identificado pela primeira vez por Choo e colaboradores (1989) como sendo o agente causador da Hepatite não-A e não-B, atualmente conhecida como Hepatite C. O vírus é o principal responsável por doenças hepáticas e transplantes de fígado. (WHO, 2018; MOHD HANAFIAH et al., 2013; PERZ et al., 2006).

A infecção possui duas fases definidas. A fase aguda, caracterizada pelos primeiros meses após a exposição ao vírus, é dificilmente identificada devido à falta de sintomatologia (DIAS; PIPA; MOTA, 2018). E a fase crônica, por sua vez pode apresentar sintomas clínicos como desconforto abdominal, fadiga, dor muscular e perda de peso. Entretanto, na maioria dos casos o diagnóstico somente é realizado quando o paciente já está com quadro grave de cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (BEINHARDT et al., 2013; MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012).

Estima-se que aproximadamente 71 milhões de pessoas estejam infectadas cronicamente em todo o mundo (WHO, 2018; MOHD HANAFIAH et al., 2013; PERZ et al., 2006). China, Paquistão, Nigéria, Egito, Índia e Rússia juntos representaram mais da metade das infecções totais (Figura 1) (GOWER et al., 2014). No Brasil, 331.855 mil casos foram notificados no país desde o final da década de 90, com maior incidência nas regiões Sul e Sudeste após o ano de 2014 (BRASIL, 2018).

Figura 1: Prevalência mundial de indivíduos infectados pelo HCV. Fonte: Adaptado de (GOWER et al., 2014)



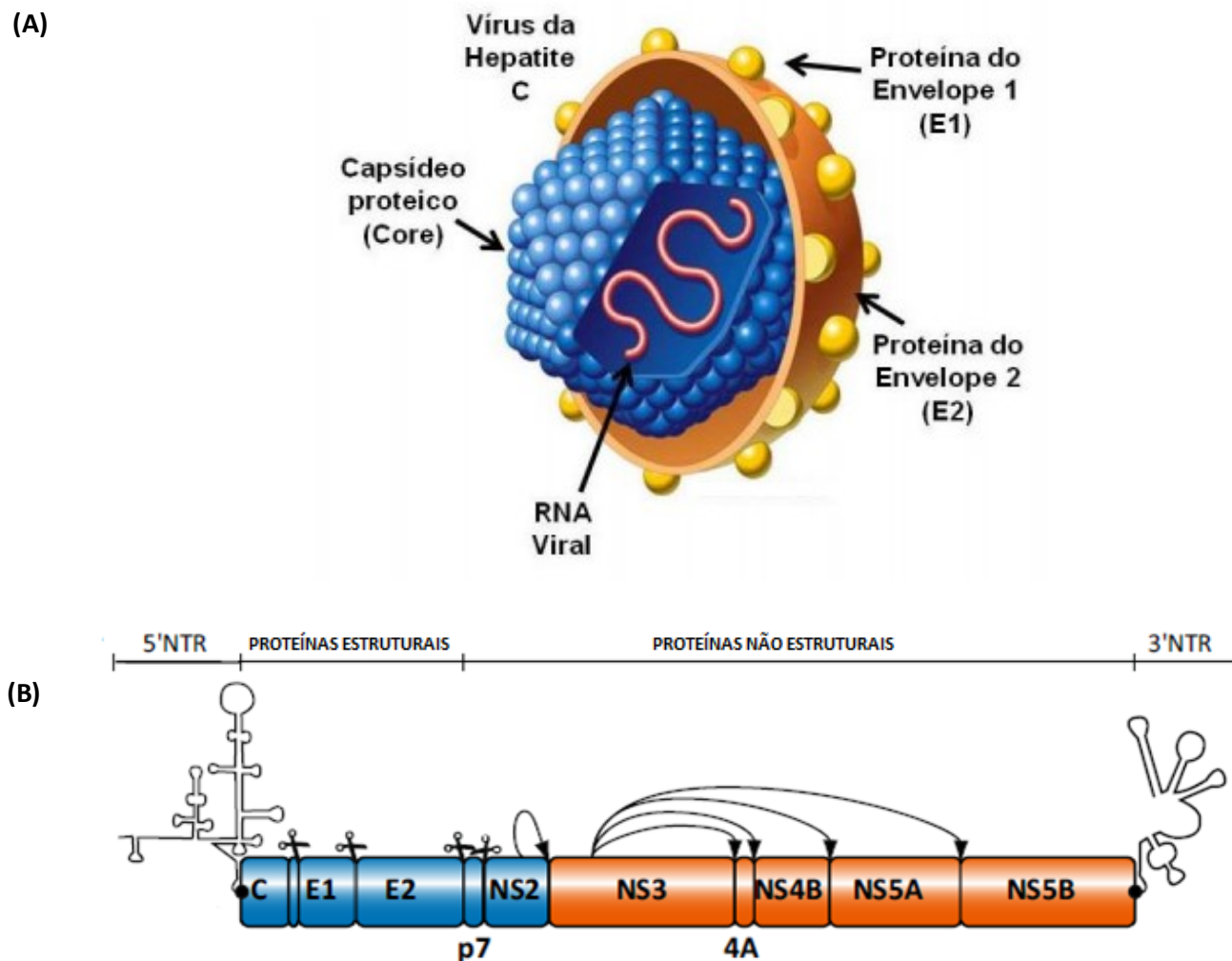
A principal via de transmissão do HCV ocorre por sangue contaminado, frequentemente durante o compartilhamento de objetos para uso de drogas injetáveis e reuso ou esterilização de materiais médicos (WHO, 2018). A transmissão também pode ocorrer verticalmente, em média 5% dos filhos de mães infectadas nascem portadores do vírus, sendo a carga viral e o estado imune da mãe os principais fatores relacionados à transmissão vertical (BENOVA et al., 2014; YEUNG; KING; ROBERTS, 2001).

### 1.2. O vírus da Hepatite C

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirius*, família *Flaviviridae* (DOUAM; LAVILLETTE; COSSET, 2015). A partícula viral apresenta tamanho de 50 nm. O genoma é constituído de uma fita simples de RNA de polaridade positiva envolvida por um capsídeo proteico e envelope lipídico derivado da membrana celular do hospedeiro, onde estão inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2 (Figura 2A) (LINDENBACH; RICE, 2013; VIEYRES et al., 2010; VIEYRES; DUBUISSON; PIETSCHMANN, 2014).

O genoma é composto por aproximadamente 9600 nucleotídeos, com apenas uma região aberta de leitura (*open reading frame* -ORF), flanqueada por regiões não traduzidas 5' e 3' não codificantes e altamente estáveis (BUKH, 2016). A região 5' contém 341 nucleotídeos, que inclui o sítio de entrada interna do ribossomo (IRES – *Internal Ribosome entry site*). A tradução do RNA viral resultará em uma poliproteína viral precursora com aproximadamente 3000 aminoácidos, que será clivada por proteases virais e celulares em novas proteínas (Figura 2B). O primeiro terço da poliproteína corresponde à proteína do capsídeo (C), as glicoproteínas do envelope E1 e E2, que estão envolvidas na entrada do vírus na célula do hospedeiro, e uma proteína de canal iônico (P7). Os dois terços finais codificam as proteínas não estruturais, que estão envolvidas nos processos intracelulares do ciclo replicativo viral, que incluem uma cisteína-protease NS2, a serino-protease NS3, o cofator de NS3 NS4A, NS4B que faz indução de malha membranosa, a RNA polimerase dependente de RNA NS5B e a proteína multifuncional NS5A. A região não-traduzida 3', altamente conservada em todos os genótipos do HCV, é composta por aproximadamente 235 nucleotídeos, e desempenha um papel importante no processo de formação do capsídeo viral durante a replicação (CATANESE et al., 2013; LOHMANN, 2018; MORADPOUR; PENIN, 2013; TANG; GRISÉ, 2009).

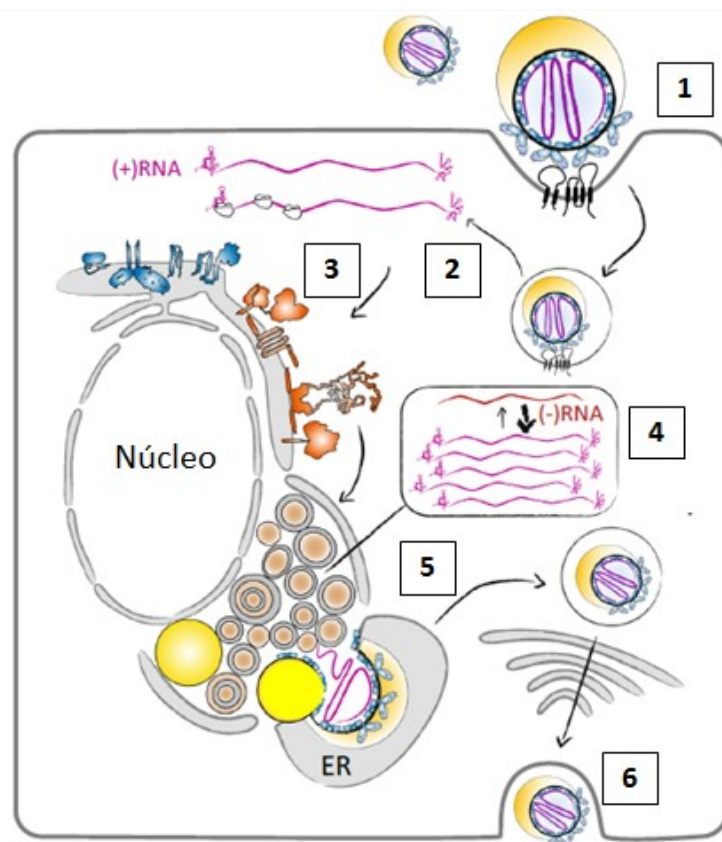
Figura 2: Partícula viral do HCV, mostrando as proteínas de envelope E1 e E2, o capsídeo e o RNA viral (A). Poliproteína viral precursor, proteínas estruturais C, E1 E2 e P7, e proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A/4B e NS5A/5B (B). Fonte: Adaptado de (LOHMANN, 2018; JAMES 2001)



O ciclo replicativo do HCV se inicia pela interação entre as proteínas no envelope viral E1 e E2 e os receptores específicos da célula hospedeira, sendo que os principais já descritos são CD81, OCLN, SR-B1 e CLDN (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; ZEISEL; FELMLEE; BAUMERT, 2013). Após adsorção a penetração do vírus ocorre por endocitose, seguida pela fusão entre a membrana viral e a endossomal, o que leva à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Logo em seguida o capsídeo é desmontado e o

RNA genômico é desnudado. O sítio de entrada interna do ribossomo (IRES) promove o início da produção da poliproteína que é processada nas proteínas virais (LOHMANN, 2013). A fita positiva de RNA serve como molde para fita complementar de sentido negativo, que juntamente com as proteínas não estruturais servirão de maquinaria para o sistema de replicação contínua. As proteínas estruturais se organizam para montagem e liberação dos novos vírions, um processo dependente da produção de lipídios da célula hospedeira (Figura 3) (KAO; YI; HUANG, 2016; LINDENBACH; RICE, 2013; VIEYRES; DUBUISSON; PIETSCHMANN, 2014).

Figura 3: Ciclo replicativo do HCV. Representação esquemática da replicação de partícula viral em um hepatócito. Adsorção e penetração (1), desnudamento (2), tradução do RNA e clivagem da poliproteína (3), replicação do RNA (4), montagem (5) e liberação (6). Fonte: Adaptado de (LOHMANN, 2018)



Análises comparativas do genoma do HCV em hospedeiros de várias regiões do mundo levaram à identificação de sete genótipos principais de HCV (SIMMONDS, 2013). De acordo com uma nomenclatura recentemente atualizada, o HCV é classificado em 7 genótipos, denominados de 1 a 7, e 67 subtipos, diferenciados por letras minúsculas (1a, 2c, 4a e assim por diante). Os genótipos diferem uns dos outros em aproximadamente 30%, e os subtipos em pelo menos 15%. (KUIKEN; SIMMONDS, 2009; SMITH et al., 2014). Devido à sua alta taxa de mutação, o HCV forma quasiespécies virais, categorizadas como a troca de bases em qualquer localidade do genoma, ou seja, um hospedeiro pode ser infectado por um subtipo viral e apresentar um número maior de quasiespécies (TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2016)

Com a análise das endemias foi possível identificar que os genótipos 1 e 2 são predominantes na África Ocidental e Central, Américas e Austrália. O genótipo 3 é encontrado no sul da Ásia, e juntamente com genótipo 1, são os genótipos de maior prevalência no Brasil (BLACH et al., 2017; BRUGGMANN et al., 2014). O genótipo 4 é prevalente na África Central e no Oriente Médio. Alguns estudos recentes mostraram que o genótipo 4 é cada vez mais identificado em alguns países do sul da Europa na região do Mediterrâneo. O genótipo 5 é responsável por um terço das infecções na África do Sul, e o genótipo 6 é comum no sul e sudeste da Ásia e em regiões do Caribe (NJOUOM et al., 2012; POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017; RAO et al., 2014). Alguns subtipos de HCV são considerados endêmicos, pois apresentam distribuição mundial, especialmente 1a, 1b e 3a e, em menor frequência, 2a, 2b e 2c (PETRUZZIELLO et al., 2016)

### **1.3. Tratamento**

Nos anos 90, o interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) foi a primeira opção pan-genotípica para tratamento dos indivíduos infectados pelo HCV, com taxas de resposta virológica sustentada (RVS) de 8% a 21%. Posteriormente, a ribavirina (RBV) foi combinada com IFN- $\alpha$ , o que aumentou as taxas de RVS para 40% (DOYLE et al., 2013). Então, IFN- $\alpha$  peguado (PEG-IFN- $\alpha$ ) associado à RBV melhorou as taxas de RVS de 42% para 52%, sendo essa a melhor opção de tratamento por um longo período de tempo. Entretanto, a baixa RVS e o alto número de efeitos colaterais nos pacientes levaram a pesquisa por outras

opções de tratamento (BANERJEE; REDDY, 2016; HOLMES; THOMPSON, 2015). Em 2011, a primeira geração de agentes antivirais de ação direta (DAAs) foi desenvolvida. Inicialmente, os inibidores de protease NS3/4A telaprevir e boceprevir foram usados associados com PEG-INF e RBV, e aumentaram a eficácia do tratamento para 65% a 75% em portadores do genótipo 1, no entanto os efeitos colaterais ainda persistiram (JITTAVISUTTHIKUL et al., 2016; TAMORI; ENOMOTO; KAWADA, 2016).

Em 2013 foi aprovado um novo DAA inibidor de NS3/4A, o simeprevir, que permitiu regimes independentes de IFN- $\alpha$  e RBV altamente eficazes, com RVS de aproximadamente 90%, e a diminuição da intolerância e dos efeitos colaterais (GUTIERREZ; LAWITZ; POORDAD, 2015). Algumas drogas que apresentam atividade inibindo a proteína NS5A também vêm sendo utilizadas, dentre elas está o ledipasvir e o declastavir (POVEDA et al., 2014). O inibidor de NS5B sofosbuvir é um dos DAAs mais usados por ter um alvo de extrema importância para a replicação (GANE et al., 2013; KISH; AZIZ; SORIO, 2017, 2017). As terapias combinadas com DAAs aumentaram as taxas de resposta e reduziram a duração do tratamento. As opções de combinações para o tratamento variam de acordo com a situação do paciente e o subgrupo viral que ele possui (LAWITZ et al., 2014).

Os DAAs possuem uma alta efetividade contra o HCV, entretanto ainda não se apresentam como opção para toda a população infectada, sendo atualmente muito caros, especialmente em alguns países de baixa e média renda (CRAXÌ et al., 2016; WOODE et al., 2016). Além disso, o HCV possui uma alta taxa de mutação em seu genoma, resultando no desenvolvimento de resistência viral ao tratamento (PERALES et al., 2015). As mutações que levam a resistência do HCV ao tratamento ocorrem em forma de variações entre os aminoácidos, que aparece devido à pressão causada pelo sistema imune e tratamento tornando-se resistente a droga utilizada. Cada composto ou família de fármaco induz um perfil específico de mutação, sendo diretamente direcionado para o sítio específico da proteína no qual apresenta efeito inibitório (GRAY et al., 2012; KLIEMANN et al., 2016). Com o surgimento de mutações de resistência, o tratamento não será eficaz, sendo necessária a mudança de estratégia (KIM; HAN; AHN, 2016).

#### 1.4. Compostos Naturais

O uso de plantas na terapia medicinal é uma prática antiga. Muitos medicamentos atuais utilizam estruturas químicas derivadas de compostos naturais, ou análogos que possuem o mesmo princípio, como base para sua produção. O sucesso dos produtos naturais na descoberta de drogas no passado e no presente está totalmente associado à sua complexa diversidade estrutural (MATHUR; HOSKINS, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Dentre os compostos naturais com atividade antiviral podem ser citados a cumarina e seus análogos que apresentam atividade para um grande espectro de vírus, como o vírus da Imunodeficiência adquirida (HIV), o vírus da Influenza e herpes, HCV e o vírus chikungunya (HASSAN et al., 2016). Alguns outros compostos como as lignanas e alcaloides isolados de plantas brasileiras também possuem atividade inibitória descrita contra o HCV (JARDIM et al., 2015; SHIMIZU et al., 2017). Compostos isolados da folha da alcachofra egípcia selvagem tem sido usados há décadas para tratamento de Hepatite (ELSEBAI et al., 2016). Alguns compostos ácidos como o ácido gálico, derivado de planta *Limonium sinense* da região da China, também demonstrou diminuir a replicação do HCV em fases iniciais da infecção (HSU et al., 2015).

Os triterpenos pentacíclicos (TP) são importantes componentes estruturais de membranas celulares de diversas plantas, estabilizando a bicamada fosfolipídica. Foi relatado que aproximadamente 20.000 triterpenóides existem na natureza (SILVA; DUARTE; FILHO, 2014). Alguns TP demonstraram atividade anti-HIV, anti-Influenza e anti-HCV (KHWAZA; OYEDEJI; ADERIBIGBE, 2018; KONG et al., 2013). O ácido oleanônico (Ac. O) é um TP natural que possui atividades biológicas já descritas, como tratamento para doença de chagas e anti-inflamatório (FUNARI et al., 2016; SHARIFI; HAZELL, 2012). O Ac.O pode ser isolado da planta *Pterogyne nitens*, conhecida popularmente como amendoim bravo, que já apresenta derivados com alguns efeitos como antifúngico em causadores de candidíase e criptococose, e atividade anti-HCV (LIMA et al., 2016; SHIMIZU et al., 2017). Visto a abrangência da atividade biológica do Ac.O e de compostos extraídos da mesma planta, este pode ser considerado um candidato para realização de estudos na replicação do HCV *in vitro*.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho avaliou os efeitos do tratamento prolongado com o composto natural Ácido oleanônico (Ac.O), isolado da planta *Pterogyne nitens*, na replicação do HCV *in vitro*.

- Avaliar a citotoxicidade do composto natural Ac.O na linhagem estável de Huh-7.5-SGR-luc-FEO, por meio de ensaios de viabilidade celular (MTT);
- Investigar o potencial desse composto na inibição da replicação do HCV por meio do tratamento de células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO e análise dos níveis de replicação por ensaios de luciferase;
- Estabelecer as concentrações efetivas de tratamento para inibição de 50 e 80% da replicação (EC50 e EC80);
- Avaliar os efeitos do Ac.O em tratamento prolongado, no período de aproximadamente 25 dias, por meio de quantificação dos níveis de luminescência em amostras de cultura celular coletadas a repique.

### 3. Metodologia

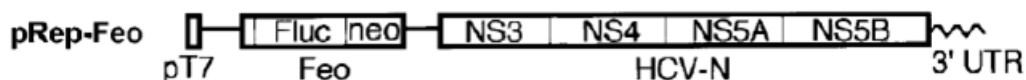
#### 3.1 Composto

O composto Ac.O foi isolado da planta *Pterogyne nitens* e purificado por Caroline Lima Sprengel, sob supervisão do Prof.º Dr.º Luís Octávio Regasini, do Laboratório de Química Verde e Medicinal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE-Unesp, São José do Rio Preto, SP.

#### 3.2 Cultura de Células

Células Huh7.5, provenientes de hepatoma humano, contendo o *replicon* subgenômico (SGRluc-FEO) (WAKITA et al., 2005) (Figura 4) foram denominadas de Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO. As culturas celulares foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; Hyclone), suplementado com 1% (v/v) de penicilina e streptomicina (Hyclone), 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (Hyclone), 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Hyclone) e geneticina (G418-Promega). As culturas serão incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem celular Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO expressa continuamente a proteína fosfotransferase de fusão da luciferase-neomicina (*firefly luciferase-neomycin phosphotransferase fusion protein*) para expressão da enzima luciferase, e para resistência a neomicina.

Figura 4: Replicon subgenômico JFH1 de genoma 2a contendo o gene FEO que expressa continuamente à proteína fosfotransferase de fusão da luciferase - neomicina denominado SGR-JFH1-FEO. Fonte: Adaptado de (WAKITA et al., 2005)



Para a determinação da viabilidade celular dos compostos, uma suspensão de 7x 10<sup>3</sup> células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO foi transferida para microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Depois deste período, o meio de cultivo dos poços foi removido e o composto Ac.O diluído em DMEM na concentração final de 1 µM foi adicionado às células. Como controle não tratado foi utilizado dimetil sulfóxido

(DSMO) a 0,1%, diluído em meio de cultura. A placa foi incubada por 72 horas na estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e as células foram adicionadas de 100 µL de solução contendo MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) (Sigma) diluído a 1mg/ml em meio DMEM, e incubadas a 37°C por 30 minutos. A solução de MTT foi removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO e submetida à leitura de absorbância em comprimento de onda de 570 nm. Os tratamentos foram realizados em triplicatas. A porcentagem da viabilidade celular foi determinada pela média dos poços tratados x 100, dividido pela média dos poços controle. Os valores obtidos da leitura de viabilidade celular foram analisados em planilha Excel e pelo software GraphPad Prism 5.

### **3.3 Ensaio de Replicação**

Para avaliar o efeito do composto Ac.O na replicação, utilizou-se a mesma metodologia de tratamento dos ensaios de viabilidade celular. Após 72 horas de tratamento, o meio foi descartado, as células foram lavadas em PBS 1x e adicionadas de tampão de lise passiva (PLB, Promega) por 30 minutos. Os lisados celulares foram adicionados de reagente para ensaio de luciferase (Luciferase Assay System, Promega) e a leitura dos níveis de luminescência foi realizada em leitor de placa (GloMax, Promega) para avaliar a atividade da luciferase. A porcentagem da replicação foi determinada pela média das triplicatas x 100, dividido pela média dos poços controle. Todos os dados foram expressos por meio de média e do desvio padrão. Os valores obtidos da leitura de atividade de luciferase foram analisados em planilha Excel e pelo software GraphPad Prism 5.

### **3.4 Ensaio de EC50 e EC80**

Para determinação da concentração de inibição de 50 ou 80% foi realizado um ensaio de replicação utilizando 12 diferentes concentrações dos compostos Ac.o. (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,3 µM, 3,1 µM, 1,6 µM, 0,7 µM, 0,4 µM, 0,2 µM e 0,1 µM). A metodologia utilizada foi a mesma do ensaio de replicação. Os valores obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 5 e foram determinadas as concentrações eficazes para inibir 50% da replicação viral (EC50) e 80% (EC80).

### **3.5 Tratamento prolongado das células com composto Ac.O**

Para avaliar os efeitos do composto Ac.O a longo prazo, uma suspensão de células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO foi transferida para garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup>. Após 4 horas, as células foram tratadas com meio completo adicionado de Ac.O ou 0.1% DMSO (controle não tratado). A concentração utilizada do composto foi correspondente ao EC50 e EC80. O meio contendo composto ou DMSO foi substituído a cada 3 ou 4 dias para a remoção de metabólitos secundários e reposição dos compostos. As células foram repicadas de acordo com a confluência, sendo que a cada repique, 2/3 das culturas foram usadas para análise. Uma parte foi lisada com tampão de lise passiva (PLB – Promega) e adicionada reagente para ensaio de luciferase (LAR; Promega) e submetidos à leitura de luminescência, para avaliar os níveis de replicação do HCV. A outra parte foi lisada com tampão CellLytic (Sigma) adicionado de inibidores de proteases, e em seguida a concentração proteica foi determinada por meio do Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) por leitura de absorbância (560nm). As culturas foram mantidas na presença do composto e DMSO durante aproximadamente 25 dias. As taxas de replicação na presença ou ausência do Ac.O foram obtidas pela normalização dos níveis de luminescência pela quantidade de proteína obtida em cada amostra. Os resultados foram apresentados em porcentagem utilizando Excel ou o software GraphPrism 5.

$$\frac{\text{Valor de Luminescência}}{\text{Quantidade de Proteína}}$$

### **3.6 Análise estatística**

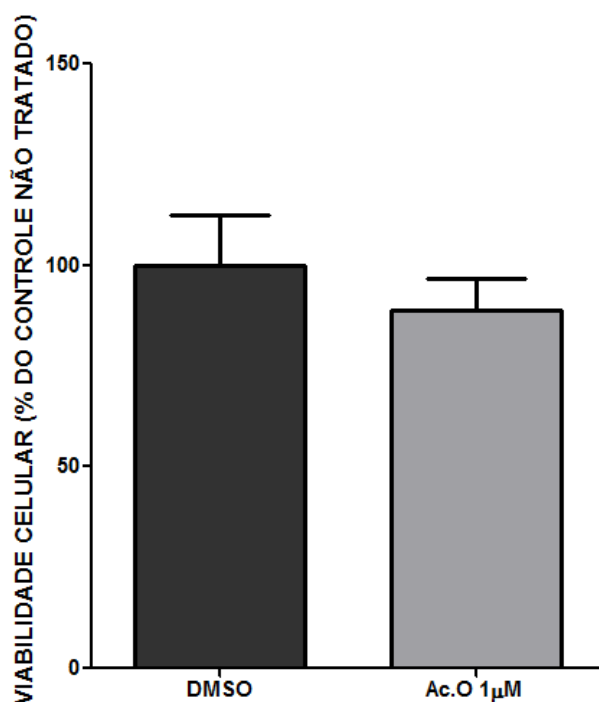
Análise estatística das diferenças foi determinada por meio de análise de variância A-NOVA a partir do teste estatístico de Dunnett, utilizando o Software GraphPad Prism 5, onde valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

## 4. Resultados

### 4.1 Análise de viabilidade celular do Ac.O.

O composto utilizado neste trabalho foi testado anteriormente quanto à viabilidade celular em células Huh-7.5 na concentração de 1  $\mu$ M em tratamento por 72 horas pelo nosso grupo de pesquisas (dados não publicados). A maior concentração não tóxica estabelecida anteriormente foi novamente testada quanto a viabilidade celular para linhagem Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO por meio de ensaios de MTT. De acordo com os resultados obtidos, o composto Ac.O 1 $\mu$ M apresentou viabilidade celular de 88% em relação ao controle não tratado DMSO. Portanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento com Ac.O não apresentou citotoxicidade significativa na concentração testada em células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO (Figura 5).

Figura 5: Viabilidade celular em células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO com o composto Ac.O na concentração de 1 $\mu$ M. Os dados são expressos em porcentagem e foram normalizados a partir do resultado do controle não tratado DMSO.



## 4.2 Análise da atividade antiviral do Ac.O

A atividade antiviral do composto Ac.O a 1  $\mu\text{M}$  na replicação do HCV foi avaliada pelo tratamento de células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO por 72 horas, com posterior leitura dos níveis de luminescência. Os resultados demonstraram que o composto Ac.O a 1  $\mu\text{M}$  inibiu 57% da replicação do HCV *in vitro* ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

Para o estabelecimento das concentrações efetivas de inibição de 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) e 80% ( $\text{EC}_{80}$ ), as células foram tratadas com concentrações do composto Ac.O de 200  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,3  $\mu\text{M}$ , 3,1  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$ , 0,7  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$  e 0,1  $\mu\text{M}$ . As células foram incubadas por 72 horas na presença Ac.O, lisadas e submetidas a leitura dos níveis de luminescência. Os valores  $\text{EC}_{50}$  e  $\text{EC}_{80}$  foram 0,9 e 2,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 7).

Figura 6: Atividade do composto Ac.O na replicação do HCV. Ensaio de Luciferase para replicação *in vitro* do HCV na presença do composto testado ou controle não tratado por 72 horas. Valores estatisticamente significantes estão representados pelo símbolo \*\*\* ( $p < 0,05$ ).

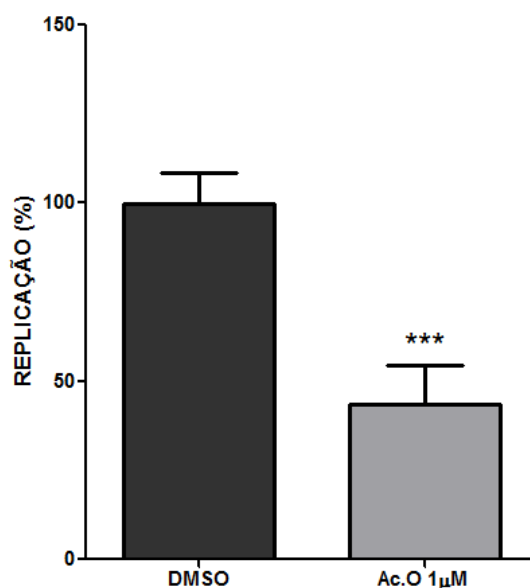
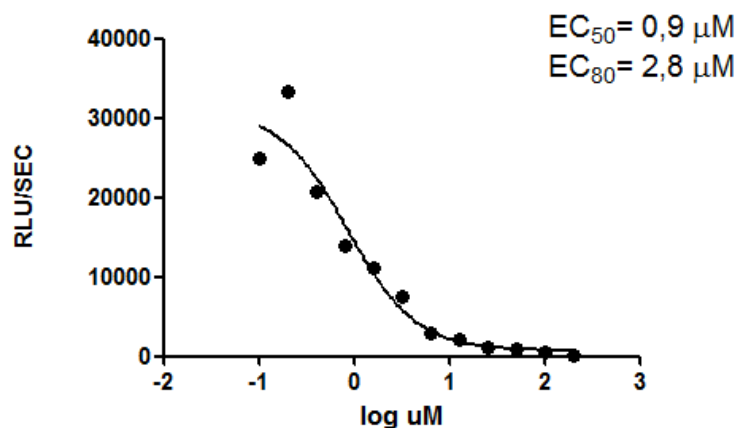


Figura 7: Concentrações efetivas de inibição em 50% ( $EC_{50}$ ) e 80% ( $EC_{80}$ ) da replicação do HCV.



#### 4.3 Tratamentos de longo Prazo

Inicialmente, o tratamento de longo prazo em células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO foi realizado com a concentração de 0,9 µM ( $EC_{50}$ ) do composto Ac.O, e as coletas foram realizadas nos dias 5, 15, 19 e 26. Os resultados demonstraram que o Ac.O inibiu 37% da replicação viral após 5 dias de tratamento (Figura 8A), com um subsequente aumento gradual na replicação do HCV nas coletas seguintes, onde os valores chegaram a 161%, 340% e 1043% de replicação nos dias 15, 19 e 26 de tratamento, respectivamente (figuras 8B, 8C e 8D). A figura 9 mostra um panorama geral desse tratamento.

Figura 8: Tratamento das células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO com Ac.O a 0,9  $\mu$ M (EC50) e níveis de replicação no 5º dia de tratamento (8A), 15º dia de tratamento (8B), 19º dia de tratamento (8C) e 26º e último de tratamento (8D).

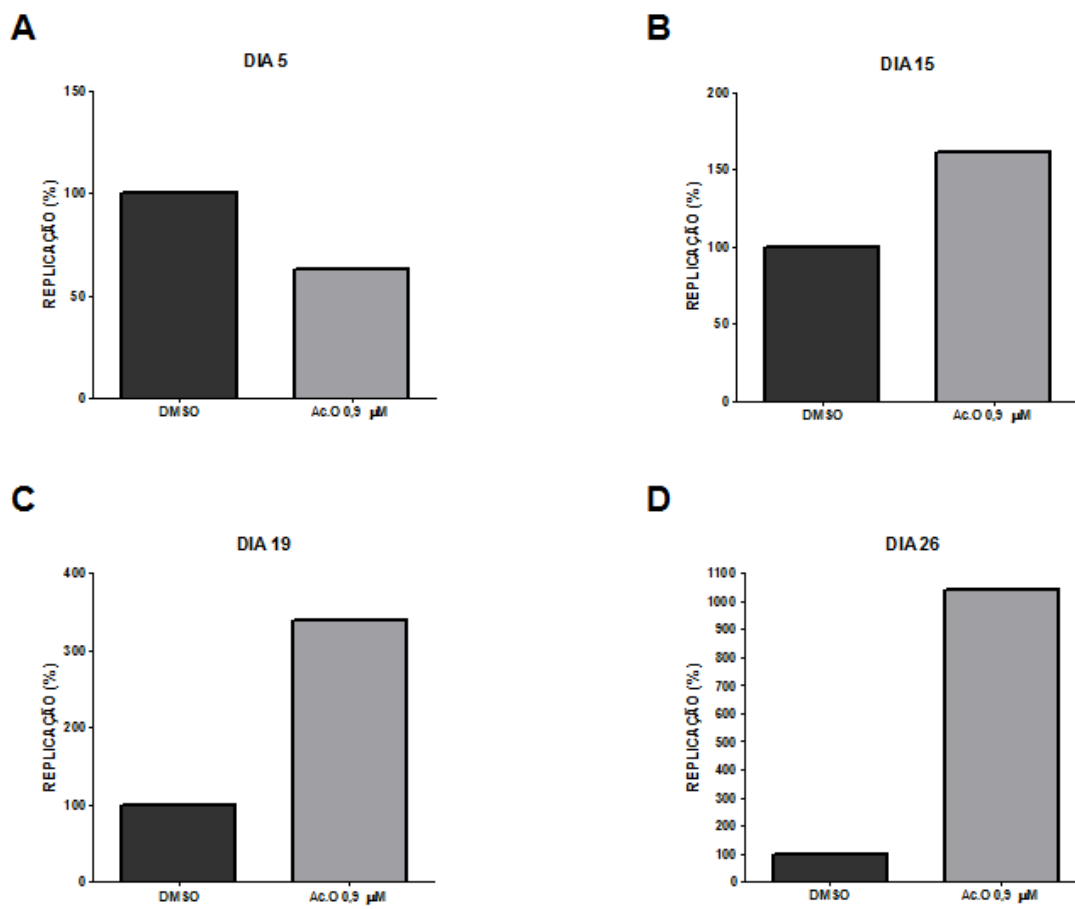
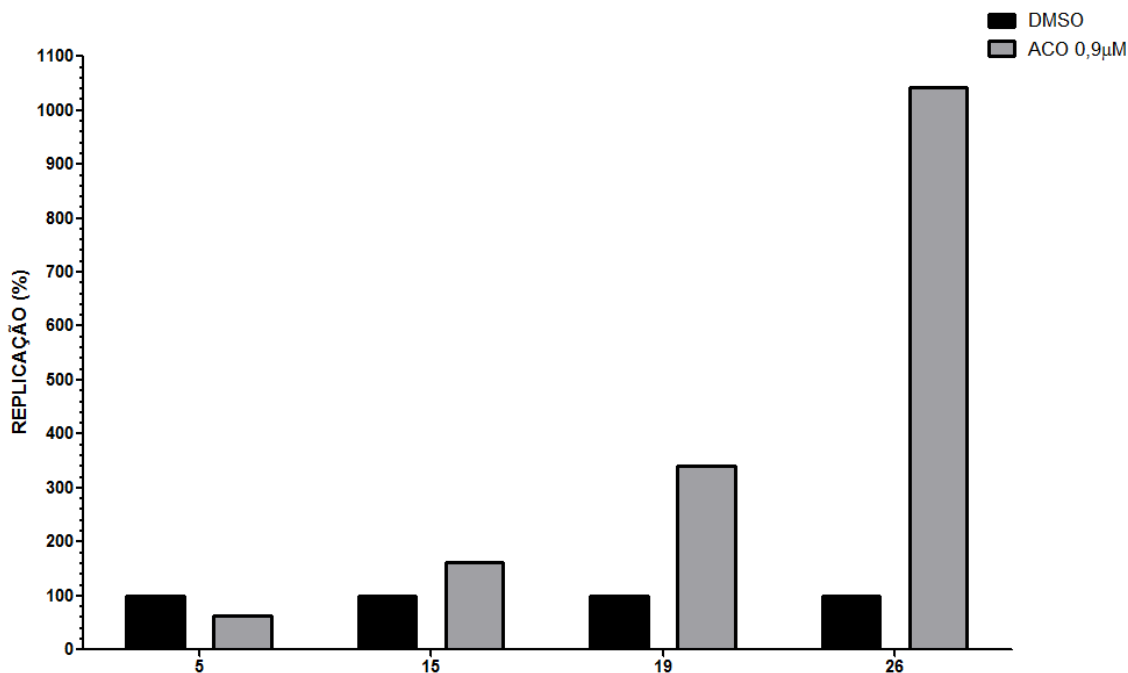


Figura 9: Panorama geral dos 26 dias de tratamento com o Ac.O na concentração de  $EC_{50}$ . Coletas realizadas nos dias 5, 15, 19 e 26.



Posteriormente, um segundo tratamento de longo prazo em células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO foi realizado com a concentração de  $2,8 \mu\text{M}$  ( $EC_{80}$ ) do composto Ac.O, e as coletas foram realizadas nos dias 8, 11, 15 e 22. Compostos resultados demonstraram que o Ac.O reduziu 81% da replicação viral após 8 dias de tratamento (Figura 10A), com aumento dos níveis de replicação para 82% e 194% nos dias 11 e 15 de tratamento respectivamente (figura 10B, 10C). No dia 22, o ultimo de tratamento, a replicação apresentou uma pequena queda, chegando a 174% (figura 10D). A figura 11 mostra o panorama geral dos 22 dias de tratamento das células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO na concentração de  $EC_{80}$  do Ac.O.

Figura 10: Replicação viral nos dias de coleta durante o tratamento das células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO, na concentração de EC80 do Ac.O. (10A) 8º dia de tratamento, (10B) 11º dia de tratamento, (10C) 15º dia de tratamento e (10D) 22º e último de de tratamento.

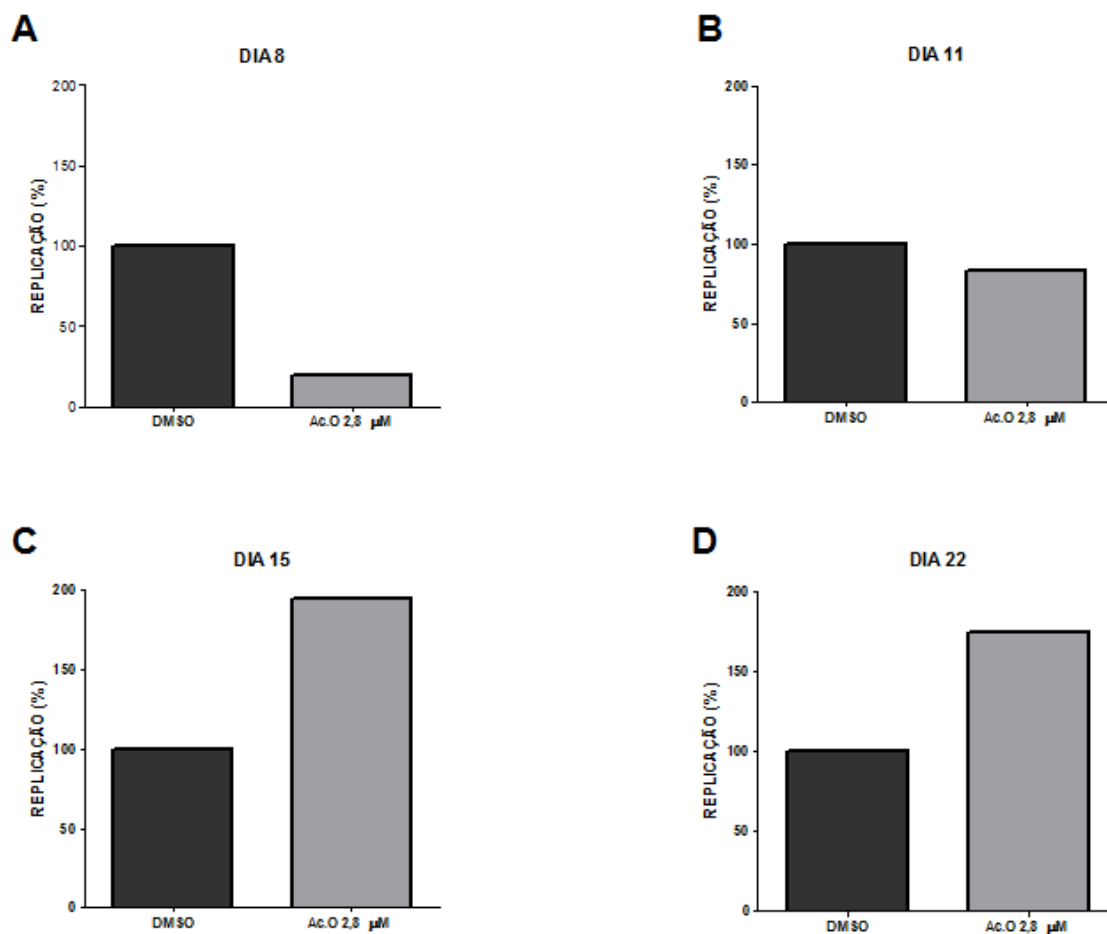
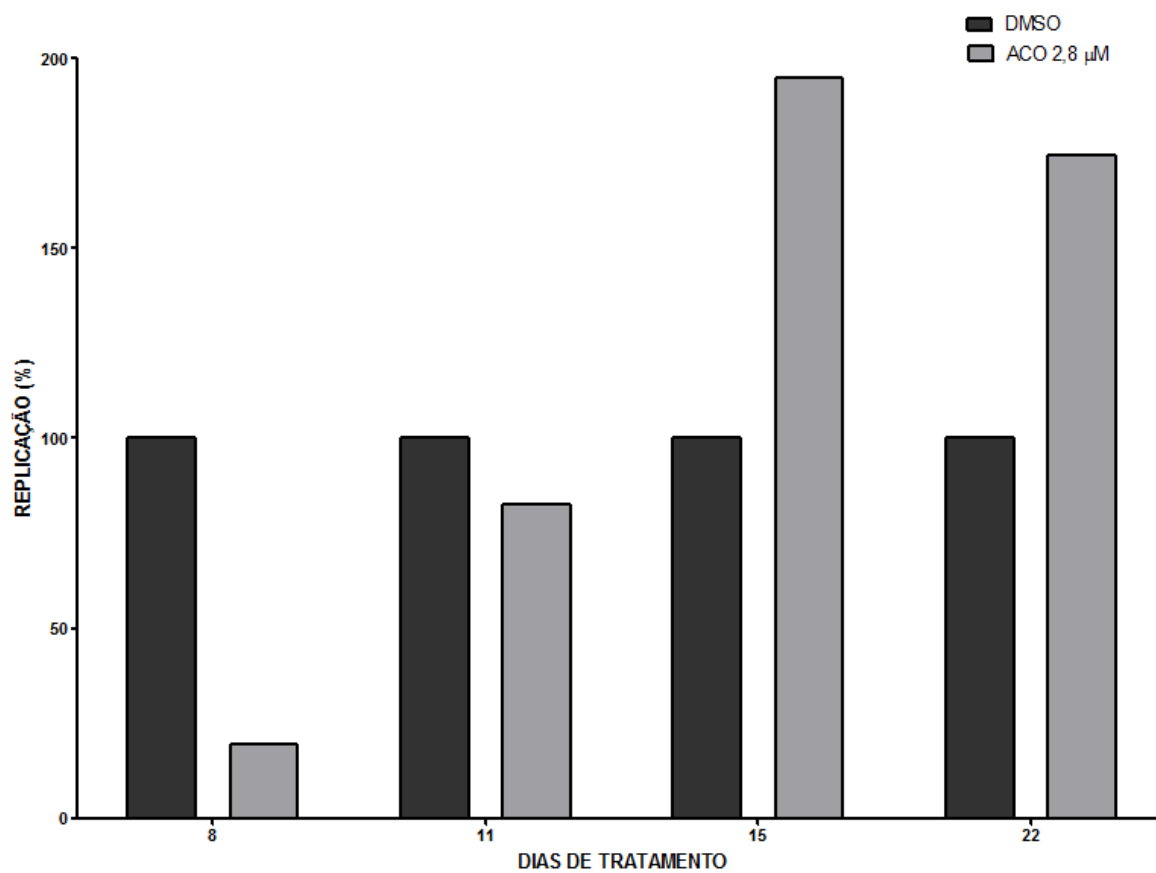


Figura 11: Panorama geral dos 22 dias de tratamento com o Ac.O na concentração de EC80. Coletas realizadas nos dias 8, 11, 15 e 22.



## 5. Discussão

A hepatite C é uma doença que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Por ser uma das principais causas de carcinoma hepatocelular e consequentemente de transplante de fígado, a infecção tornou-se um grande problema de saúde pública mundial (YAGHOBI et al., 2018). Não há vacina para prevenir a infecção pelo HCV, e os métodos terapêuticos atuais apresentam alto custo e altas taxas de mutações de resistência, levando a falha ao tratamento (BETHEA et al., 2018; JI et al., 2018; KIM; HAN; AHN, 2016).

Portanto, o desenvolvimento de novas drogas que agem inibindo diretamente a replicação do HCV é muito importante. As terapias atuais são realizadas em monoterapias ou em combinações de diferentes drogas que agem em diferentes pontos da replicação viral, o que potencializa a necessidade de pesquisar novas terapêuticas anti-HCV serem desenvolvidas (BERTINO et al., 2016; PAWLOTSKY, 2011). Hézode e colaboradores (2016) demonstraram que pacientes infectados cronicamente com HCV do genótipo 1 e 4 inicialmente tratados com daclatasvir (inibidor de proteína não estrutural NS5A) apresentaram variantes de resistência ao medicamento, e a terapia alternativa de sofosbuvir (inibidor de NS5B) combinado com simeprevir (inibidor de NS3/4A) foi eficaz em 85% dos casos. Os outros 15% dos pacientes também apresentaram mutações específicas de resistência ao simeprevir. Frente a esses perfis, compostos naturais podem ser candidatos a terapias combinadas para o tratamento de pacientes cronicamente infectados com o HCV.

Neste estudo demonstramos que o composto Ac.O isolado de plantas naturais foi capaz de inibir significativamente 57% da replicação do HCV *in vitro* na concentração de 1  $\mu$ M em ensaio de 72 horas. Além disso, a concentração efetiva estabelecida em nossos ensaios apresentou uma concentração baixa de 0,9 $\mu$ M para inibir 50% da replicação. Yu e colaboradores (2013) descreveram a atividade anti-HCV do composto ácido oleanólico, que também faz parte dos triterpenos pentacíclicos, bloqueando a entrada do vírus na célula. O mesmo grupo desenvolveu análogos desse composto que apresentam valores de EC<sub>50</sub> em concentrações extremamente baixa, de 1,4  $\mu$ M a 10 nM (XIAO et al., 2014). Os dados apresentados confirmam a alta capacidade de compostos naturais e mais especificamente dos TPs como potentes compostos anti-HCV. Além disso, os TPs também apresentaram atividade antiviral para outros vírus. O ácido oleanólico também demonstrou atividade contra o vírus da Hepatite B, Influenza e vírus da imunodeficiência adquirida (KHWAZA;

OYEDEJI; ADERIBIGBE, 2018). Para os tratamentos de longo prazo, nossos resultados demonstraram uma diminuição na replicação do HCV durante os primeiros dias de tratamento, com um aumento gradual da replicação nos pontos de coleta subsequentes. Essa dinâmica viral é vista em pessoas infectadas cronicamente com HCV no qual a terapia utilizada induz o aparecimento de variantes ligadas a resistência. Krishnan e colaboradores (2015) mostraram em um estudo o perfil de pacientes tratados com o ombitasvir (inibidor de NS5A), que nos primeiros dias a carga viral dos pacientes diminuiu significativamente e nos dias seguintes teve um aumento gradual desses títulos virais, demonstrando um aumento da replicação do HCV, devido a mutações na região NS5A.

Portanto, essa diminuição e posteriormente aumento na replicação viral são observados em pacientes infectados cronicamente com o HCV, onde o vírus adquire mutações de resistência ao tratamento proposto (DUFNER-BEATTIE et al., 2014). Chen e colaboradores (2016) demonstraram em seus resultados um amplo quadro de variantes virais associadas à resistência do HCV aos DAAs. As mutações ocorreram no local do genoma que traduz a proteína onde ocorre o modo de ação do medicamento. Algumas mutações são exclusivas de apenas um genótipo ou subtipo, mas outras abrangem mais de um, o que dificulta no momento da escolha do tratamento correto para o paciente (KLIEMANN et al., 2016). Alguns exemplos são as variantes Q80K e D168E específicas da região NS3/4A, QR30 da região NS5B e V499A da região da NS5A (LI et al., 2017). As informações obtidas nesses estudos sustentam a hipótese de que mutações de resistência possam ter ocorrido no replicon subgenômico de células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO, levando ao aumento dos níveis de replicação durante o tratamento a longo prazo com o Ac.O.

A dinâmica de replicação do HCV em humanos cronicamente infectados combina uma alta taxa de produção viral com uma RNA polimerase propensa a erros, fornecendo um cenário favorável para o surgimento e enriquecimento de substituições de nucleotídeos virais (RONG et al., 2010; SARRAZIN, 2016). Os autores Wyles e Luetkemeyer (2017) mostraram que essas substituições de nucleotídeos podem não ter impacto algum, mas quando ocorrem na presença de algum fármaco, a pressão causada sobre o vírus pode gerar mutações que caracterizam resistência ao tratamento proposto, ou até mesmo a toda classe dessa droga. Os resultados observados por Wyles e Luetkemeyer corroboram com os dados

obtidos neste estudo, indicando que uma das possíveis explicações para o aumento da replicação viral em tratamentos prolongados com Ac.O pode ser devido a pressão seletiva exercida por esse composto na replicação do vírus nas células Huh-7.5-SGR-JFH1-luc-FEO.

O Ac.O apresentou atividade antiviral significativa nos primeiros dias da replicação viral, mas nos dias seguintes mostrou induzir um aumento na replicação. Esses resultados sugerem que o aumento da replicação pode ser devido ao surgimento de mutações de resistência, devido à pressão seletiva do tratamento com Ac.O. A investigação do modo de ação do Ac.O e quais mutações podem ter levado a resistência é um caminho promissor para futuras abordagens.

## 6. Referências

- BANERJEE, D.; REDDY, K. R. Review article: safety and tolerability of direct-acting anti-viral agents in the new era of hepatitis C therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 6, p. 674–696, mar. 2016.
- BEINHARDT, S. et al. A diagnostic score for the prediction of spontaneous resolution of acute hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 972–977, 1 nov. 2013.
- BENOVA, L. et al. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 6, p. 765–773, 15 set. 2014.
- BERTINO, G. et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 92–106, 18 jan. 2016.
- BETHEA, E. D. et al. Should we treat acute hepatitis C? A decision and cost-effectiveness analysis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 67, n. 3, p. 837–846, 2018.
- BLACH, S. et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 3, p. 161–176, 1 mar. 2017.
- BRASIL. Hepatite -Panorama atual. Disponível em < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hepatite-panorama-atual>> Acesso em: 03/10/2018
- BRUGGMANN, P. et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21 Suppl 1, p. 5–33, maio 2014.
- BUKH, J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. **Journal of Hepatology**, New Perspectives in HCV Infection. v. 65, n. 1, Supplement, p. S2–S21, 1 out. 2016.
- CATANESE, M. T. et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 23, p. 9505–9510, 4 jun. 2013.
- CHEN, Z. et al. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. **Scientific Reports**, v. 6, 4 fev. 2016.
- CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 21 abr. 1989.
- CRAXÌ, L. et al. Prioritization of high-cost new drugs for HCV: making sustainability ethical. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1044–1051, 2016.
- DIAS, C.; PIPA, S.; MOTA, M. Acute hepatitis C from heterosexual transmission. **IDCases**, v. 14, p. e00448, 2018.

- DOUAM, F.; LAVILLETTE, D.; COSSET, F.-L. Chapter Three - The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. In: KLASSE, P. J. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. The Molecular Basis of Viral Infection. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 129p. 63–107.
- DOYLE, J. S. et al. Current and emerging antiviral treatments for hepatitis C infection. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 931–943, 1 abr. 2013.
- DUFNER-BEATTIE, J. et al. Identification of AP80978, a Novel Small-Molecule Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication That Targets NS4B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3399–3410, jun. 2014.
- ELSEBAI, M. F. et al. Pan-genotypic Hepatitis C Virus Inhibition by Natural Products Derived from the Wild Egyptian Artichoke. **Journal of Virology**, v. 90, n. 4, p. 1918–1930, 28 jan. 2016.
- FUNARI, C. S. et al. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 4, p. 411–416, dez. 2016.
- GANE, E. J. et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 1, p. 34–44, 3 jan. 2013.
- GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S45–57, nov. 2014.
- GRAY, R. R. et al. A New Evolutionary Model for Hepatitis C Virus Chronic Infection. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002656, 3 maio 2012.
- GUTIERREZ, J. A.; LAWITZ, E. J.; POORDAD, F. Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, n. 11, p. 861–870, nov. 2015.
- HASSAN, M. Z. et al. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 236–255, 10 nov. 2016.
- HÉZODE, C. et al. Retreatment with sofosbuvir and simeprevir of patients with hepatitis C virus genotype 1 or 4 who previously failed a daclatasvir-containing regimen. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 63, n. 6, p. 1809–1816, 2016.
- HOLMES, J. A.; THOMPSON, A. J. Interferon-free combination therapies for the treatment of hepatitis C: current insights. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**, v. 7, p. 51–70, 2015.
- HSU, W.-C. et al. Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. **Antiviral Research**, v. 118, p. 139–147, 1 jun. 2015.
- JARDIM, A. C. G. et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 115, p. 39–47, mar. 2015.
- Ji, F. et al. Individual surveillance using model-based hepatocellular carcinoma risk estimates in chronic hepatitis C patients after antiviral treatment. **Journal of Hepatology**, 15 out. 2018.

- JITTAVISUTTHIKUL, S. et al. Human Transbodies to HCV NS3/4A Protease Inhibit Viral Replication and Restore Host Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 318, 2016.
- KAO, C. C.; YI, G.; HUANG, H.-C. The core of hepatitis C virus pathogenesis. **Current Opinion in Virology**, Viral pathogenesis • Preventive and therapeutic vaccines. v. 17, p. 66–73, 1 abr. 2016.
- KHWAZA, V.; OYEDEJI, O. O.; ADERIBIGBE, B. A. Antiviral Activities of Oleanolic Acid and Its Analogues. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 9, 9 set. 2018.
- KIM, S.; HAN, K.-H.; AHN, S. H. Hepatitis C Virus and Antiviral Drug Resistance. **Gut and Liver**, v. 10, n. 6, p. 890–895, nov. 2016.
- KISH, T.; AZIZ, A.; SORIO, M. Hepatitis C in a New Era: A Review of Current Therapies. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, n. 5, p. 316–329, maio 2017.
- KLIEMANN, D. A. et al. Polymorphisms and resistance mutations of hepatitis C virus on sequences in the European hepatitis C virus database. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 40, p. 8910–8917, 28 out. 2016.
- KONG, L. et al. Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. **Antiviral Research**, v. 98, n. 1, p. 44–53, abr. 2013.
- KRISHNAN, P. et al. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 979–987, fev. 2015.
- KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 510, p. 33–53, 2009.
- LAWITZ, E. et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9956, p. 1756–1765, 15 nov. 2014.
- LI, Z. et al. Naturally occurring drug resistance associated variants to hepatitis C virus direct-acting antiviral agents in treatment-naïve HCV genotype 1b-infected patients in China. **Medicine**, v. 96, n. 19, 12 maio 2017.
- LIMA, C. S. et al. Anti-Candida and anti-Cryptococcus evaluation of 15 non-alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 841–845, 1 out. 2016.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 688–700, out. 2013.
- LOHMANN, V. Hepatitis C virus RNA replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 369, p. 167–198, 2013.

- LOHMANN, V. Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. **Medical Microbiology and Immunology**, 8 out. 2018.
- MAASOUMY, B.; WEDEMEYER, H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 4, p. 401–412, ago. 2012.
- MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 6, p. 612–614, jun. 2017.
- MOHD HANAFIAH, K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 57, n. 4, p. 1333–1342, abr. 2013.
- MORADPOUR, D.; PENIN, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 369, p. 113–142, 2013.
- MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 453–463, jun. 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.
- NJOUM, R. et al. Phylogeography, risk factors and genetic history of hepatitis C virus in Gabon, central Africa. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e42002, 2012.
- PAWLOTSKY, J.-M. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 1742–1751, 1 maio 2011.
- PERALES, C. et al. Resistance of Hepatitis C Virus to Inhibitors: Complexity and Clinical Implications. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5746–5766, 6 nov. 2015.
- PERZ, J. F. et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **Journal of Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 529–538, out. 2006.
- PETRUZZIELLO, A. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 34, p. 7824–7840, 14 set. 2016.
- POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **The Lancet. Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 3, p. 161–176, 2017.
- POVEDA, E. et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. **Antiviral Research**, v. 108, p. 181–191, ago. 2014.
- RAO, H. et al. Distribution and clinical correlates of viral and host genotypes in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 545–553, mar. 2014.

- RONG, L. et al. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 30, p. 30ra32, 5 maio 2010.
- SARRAZIN, C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 2, p. 486–504, 1 fev. 2016.
- SHARIFI, M. S.; HAZELL, S. L. Isolation, Analysis and Antimicrobial Activity of the Acidic Fractions of Mastic, Kurdica, Mutica and Cabolica Gums from Genus Pistacia. **Global Journal of Health Science**, v. 4, n. 1, p. 217–228, jan. 2012.
- SHIMIZU, J. F. et al. Flavonoids from *Pterogyne nitens* Inhibit Hepatitis C Virus Entry. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16127, 23 nov. 2017.
- SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; FILHO, S. A. V. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1205–1220, 20 jun. 2014.
- SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 369, p. 1–15, 2013.
- SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 59, n. 1, p. 318–327, jan. 2014.
- TAMORI, A.; ENOMOTO, M.; KAWADA, N. **Recent Advances in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/6841628/>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- TANG, H.; GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 117, n. 2, p. 49–65, 15 jun. 2009.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KOHARA, M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. **International Journal Molecular Science**, v. 19, n. 23, 2016.
- VIEYRES, G. et al. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10159–10168, out. 2010.
- VIEYRES, G.; DUBUISSON, J.; PIETSCHMANN, T. Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1149–1187, 11 mar. 2014.
- WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nature Medicine**, v. 11, n. 7, p. 791–796, jul. 2005.
- WHO. Hepatitis C, Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 03/10/2018
- WOODE, M. E. et al. Potential market size and impact of hepatitis C treatment in low- and middle-income countries. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 23, n. 7, p. 522–534, 2016.

WYLES, D. L.; LUETKEMEYER, A. F. Understanding Hepatitis C Virus Drug Resistance: Clinical Implications for Current and Future Regimens. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 25, n. 3, p. 103–109, jul. 2017.

XIAO, S. et al. Synthesis and anti-HCV entry activity studies of  $\beta$ -cyclodextrin-pentacyclic triterpene conjugates. **ChemMedChem**, v. 9, n. 5, p. 1060–1070, maio 2014.

YAGHOBI, R. et al. Significance of Occult Hepatitis C Virus Infection in Liver Transplant Patients With Cryptogenic Cirrhosis. **Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, 19 out. 2018.

YEUNG, L. T. F.; KING, S. M.; ROBERTS, E. A. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 223–229, 1 ago. 2001.

YU, F. et al. Development of oleanane-type triterpenes as a new class of HCV entry inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4300–4319, 13 jun. 2013.

ZEISEL, M. B.; FELMLEE, D. J.; BAUMERT, T. F. Hepatitis C virus entry. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 369, p. 87–112, 2013.