

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta dissertação será
disponibilizado somente
a partir de 06/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Carina Machado Pereira

**Avaliação da atividade antiviral de compostos naturais e sintéticos
no ciclo replicativo do HCV *in vitro***

São José do Rio Preto
2018

Carina Machado Pereira

**Avaliação da atividade antiviral de compostos naturais e sintéticos
no ciclo replicativo do HCV *in vitro***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Gomes Jardim

Coorientadoras: Prof^a Dr^a Paula Rahal e Prof^a Dr^a Cintia Bittar Oliva

São José do Rio Preto
2018

Pereira, Carina Machado.

Avaliação da atividade antiviral de compostos naturais e sintéticos no ciclo replicativo do HCV *in vitro* / Carina Machado Pereira . -- São José do Rio Preto, 2018

69 f. : il.

Orientador: Ana Carolina Gomes Jardim

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Agentes antivirais. 3. Vírus. 4. Virologia. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Carina Machado Pereira

**Avaliação da atividade antiviral de compostos naturais e sintéticos
no ciclo replicativo do HCV *in vitro***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Gomes Jardim

Coorientadoras: Prof^a Dr^a Paula Rahal e Prof^a Dr^a Cintia Bittar Oliva

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Cintia Bittar Oliva

UNESP - São José do Rio Preto/SP

Coorientador

Prof^a Dr^a Marília de Freitas Calmon

UNESP - São José do Rio Preto/SP

Dr^a Ana Cláudia Silva Braga

Inpenha Biotecnologia – Jaboticabal/SP

São José do Rio Preto
06 de março de 2018

**Dedico este trabalho à minha mãe, Zilda
Ap. de Oliveira Machado Pereira, por
sempre acreditar em mim e fazer tudo o
que é possível para ver o meu
crescimento.**

Agradecimentos

À minha Orientadora Prof^ª Dr^ª Ana Carolina Gomes Jardim e às minhas coorientadoras Prof^ª Dr^ª Paula Rahal e Prof^ª Dr^ª Cintia Bittar, principalmente pela oportunidade, pela assistência, apoio e confiança depositada.

À todos os amigos do Laboratório de Estudos Genômicos, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e aprendizado, pela convivência diária, apoio, ajuda e amizade.

À minha amiga Suely da Silva, que compartilhou comigo e me apoiou nas principais dificuldades encontradas no mestrado.

À minha família, especialmente minha mãe Zilda Ap. de Oliveira Machado Pereira e minha irmã Camilla Machado Pereira, pelo carinho, paciência, compreensão, preocupação e apoio.

Ao meu noivo Carlos Eduardo Ferreira Ruivo, por toda a paciência e apoio dedicados em todos os momentos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A hepatite C é uma doença causada pelo vírus da Hepatite C (HCV) que acomete aproximadamente 115 milhões de pessoas. O tratamento atual para os pacientes infectados consiste na combinação de antivirais de ação direta (DAAs), que apesar de apresentar resposta virológica sustentada satisfatória já apresentam variantes resistentes descritas. Estes medicamentos também representam significativos gastos para o sistema público de saúde, além de causarem efeitos colaterais. Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos se faz necessário. Compostos naturais e seus derivados sintéticos têm sido descritos pela atividade antiviral contra diversos vírus, como os vírus da Dengue (DENV), Febre amarela (YFV), Herpes (HSV), Imunodeficiência Humana (HIV) e HCV. Nesse estudo, a atividade antiviral de 10 compostos isolados de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (TOXs) e de 16 acridonas sintéticas (Facs) foi avaliada, utilizando linhagem celular Huh-7.5 e partículas virais JFH-1 HCVcc genótipo 2a. Oito TOXs e dois Facs inibiram significativamente a infecção pelo HCV. Os compostos com maior inibição, TOX1 (SI = 1736), TOX3 (SI = 13,5), Fac15 (SI = 1,72) e Fac17 (SI = 1,65), demonstraram reduzir a infecção em 96%, 84,7%, 58% e 48%, respectivamente, agindo diretamente nas partículas virais. TOX1 e Fac15 também reduziram a infectividade viral em 87% e 39% nas células hospedeiras por ação protetora, após o pré-tratamento das células. Com este trabalho, concluímos que tanto os compostos isolados de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* quanto as acridonas sintéticas podem ser eficientes na inibição do HCV.

Palavras-chave: Hepatite C. HCV. Antiviral. Veneno de serpente. Acridonas sintéticas.

ABSTRACT

Hepatitis C is a disease caused by Hepatitis C virus (HCV) that affects approximately 115 million people. The current treatment for infected patients consists of the combination of direct acting antivirals (DAAs), which despite presenting satisfactory sustained virological response already presents resistant variants described. These drugs also represent significant costs to the public health system and cause side effects. Therefore, the development of new therapeutic agents is needed. Natural compounds and their synthetic derivatives have been described as antivirals against several viruses as Dengue (DENV), Yellow fever (YFV), Herpes (HSV), Human immunodeficiency virus (HIV) and HCV. In this study, the antiviral activity of 10 compounds isolated from Bothrops snake venoms (TOXs) and 16 synthetic acridones (Facs) was evaluated, using Huh-7.5 cell line and JFH-1 HCVcc genotype 2a virus particles. Eight TOXs and two Facs significantly inhibited the HCV infection. The compounds with the highest inhibition, TOX1 (SI = 1736), TOX3 (SI = 13.5), Fac15 (SI = 1.72) and Fac17 (SI = 1.65), demonstrated to reduce the infection in 96%, 84.7%, 58% and 48%, respectively, by acting directly on the viral particles. TOX1 and Fac15 also reduced 87% and 39% of viral infectivity in host cells by protective action after pre-treatment of cells. With this work, we conclude that either compounds isolated from Bothrops snake venoms and synthetic acridones may be efficient in inhibiting HCV.

Keywords: Hepatitis C. HCV. Antiviral. Snake venom. Synthetic acridones.

Sumário

CAPÍTULO I.....	11
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. A Hepatite C.....	12
1.2. O vírus da hepatite C.....	13
1.3. Ciclo replicativo do HCV.....	15
1.4. Tratamento.....	17
1.5. Compostos naturais e sintéticos com potencial antiviral.....	18
2. OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.1. Objetivos Específicos.....	19
3. REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO II.....	30
HEPATITIS C VIRUS INFECTION IS INHIBITED <i>IN VITRO</i> BY <i>BOTHRUPS</i> SNAKE VENOMS COMPOUNDS.....	31
ABSTRACT.....	32
1. INTRODUCTION.....	33
2. MATERIAL AND METHODS.....	34
2.1. Compounds isolated from snake venoms.....	34
2.2. Cell Culture.....	34
2.3. Cell viability assay.....	34
2.4. Viral assays.....	35
2.4.1. Evaluation of compounds activity on HCV infectivity.....	35
2.4.2. Antiviral activity on entry steps.....	35
2.4.3. Effect against HCV replication.....	36
2.5. Statistical analysis.....	36
3. RESULTS.....	36
3.1. Inhibitory effect of snake venom compounds on HCV infectivity.....	36
3.2. Snake venom compounds blocked HCV entry, but did not interfere with.....	39
4. DISCUSSION.....	41

5. CONCLUSION	43
6. REFERENCES.....	44
CAPÍTULO III	47
SYNTHETIC ACRIDONES INHIBIT HEPATITIS C VIRUS ENTRY <i>IN VITRO</i>	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUCTION	50
2. MATERIAL AND METHODS.....	51
2.1. <i>Acridones</i>	51
2.2. <i>Cell culture</i>	51
2.3. <i>Cell viability assay</i>	51
2.4. <i>Viral assays</i>	52
2.4.1. Effect of acridones on HCV infectivity	52
2.4.2. Antiviral activity of acridones on HCV entry steps	52
2.4.3. Effect of acridones on HCV replication	53
2.5. <i>Statistical analysis</i>	53
3. RESULTS.....	53
3.1. <i>Cell viability assay</i>	53
3.2. <i>Acridones Fac15 and Fac17 inhibit HCV infectivity</i>	54
3.3. <i>Antiviral activity of acridones on HCV entry</i>	56
3.4. <i>The acridones did not reduce HCV replication</i>	57
4. DISCUSSION	58
5. CONCLUSION	60
6. REFERENCES.....	61
CAPÍTULO IV	65
CONCLUSÃO.....	65
CAPÍTULO V	67
ARTIGOS PUBLICADOS.....	67

CAPÍTULO I

Considerações gerais

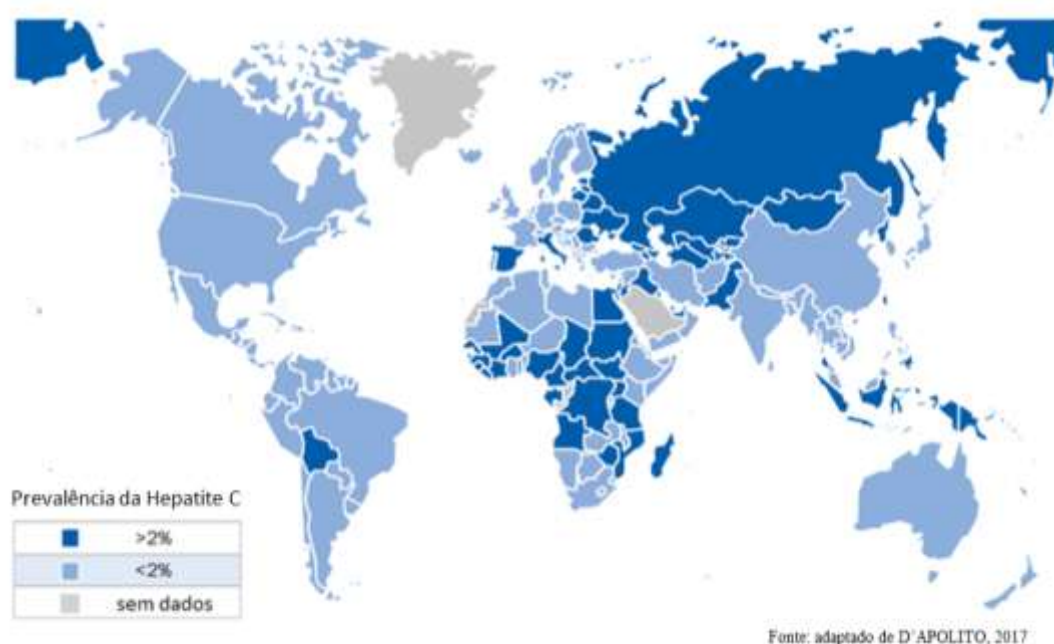
1. Introdução

1.1. A Hepatite C

Com o desenvolvimento de diagnósticos específicos para os vírus da hepatite A (VHA) e da hepatite B (VHB) na década de 1970, ficou claro que a maioria dos casos de hepatite decorrentes de transfusão de sangue não era causada por estes ou outros agentes virais conhecidos (CHOO et al., 1989). Passaram então a denominar esse tipo de doença como hepatite não-A e não-B, que ainda na década de 1970 recebeu a denominação de hepatite C, quando Choo e colaboradores identificaram o vírus da hepatite C (HCV) como causador da doença (CHOO et al., 1989). A prevalência global da infecção pelo HCV tem sido estimada em aproximadamente 115 milhões de pessoas em todo o planeta (LANINI et al., 2016) (Figura 1). Entre 71 e 79 milhões desses pacientes apresentam infecção crônica, sendo maior a prevalência no Mediterrâneo Oriental (2,3%), seguido pela Região Europeia (1,5%) (GOWER et al., 2014; LANINI et al., 2016; WHO, 2017).

De 1999 a 2016, mais de 182.389 pacientes confirmados com HCV foram identificados pelo sistema de vigilância brasileiro (BRASIL, 2017). Além disso, estudos demonstraram uma prevalência do vírus de 0,62% na região Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul (PALTANIN; REICHE, 2002; BRASIL, 2017).

Figura 1. Prevalência global da hepatite C.



A Hepatite C se caracteriza em duas fases, aguda e crônica (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012). A fase aguda sintomática ocorre em cerca de 15% dos pacientes que estão infectados com o HCV, apresentando sintomas como febre, falta de apetite, vômito, dor abdominal e icterícia, sendo por esta razão muitas vezes não diagnosticada corretamente (MAHESHWARI et al., 2008; WHO, 2016). A taxa de diagnóstico estimado na Inglaterra, por exemplo, é de 35%, o que sugere que 65% da população total HCV-positiva permanece sem diagnóstico (MILLER; DILLON, 2015). Cerca de 50-80% dos pacientes com hepatite C aguda progridem para hepatite C crônica e de 20 a 50% dos pacientes apresentam cura espontânea sem tratamento (CHO et al., 2014).

A hepatite C crônica é uma das principais causas de doença hepática e transplante de fígado em todo o mundo, pois pode causar danos contínuos nesse órgão e resultar em cirrose e carcinoma hepatocelular (CASTRO et al., 2015; WANDELER et al., 2015). Pacientes com esse tipo de hepatite podem reportar sintomas como desconforto abdominal direito, náusea, fadiga, dor muscular, dor articular e perda de peso, no entanto, esses sinais clínicos não são comuns e na maioria dos casos são restritos a cirrose hepática avançada (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012). Tratamentos antivirais reduzem a progressão da fibrose hepática e podem reverter a cirrose, porém, mesmo em países desenvolvidos, a mortalidade por hepatite C está aumentando devido ao diagnóstico incorreto e ao tratamento inadequado (PRECIADO et al., 2014).

A transmissão do HCV ocorre principalmente pelo contato com sangue contaminado, pela transfusão de sangue e compartilhamento de agulhas e seringas não esterilizadas (LAI et al., 2003; SHEN et al., 2014). O uso de drogas injetáveis e injeções não seguras resultou em um grande número de infecções por HCV durante o século 20 (ARMSTRONG, 2003).

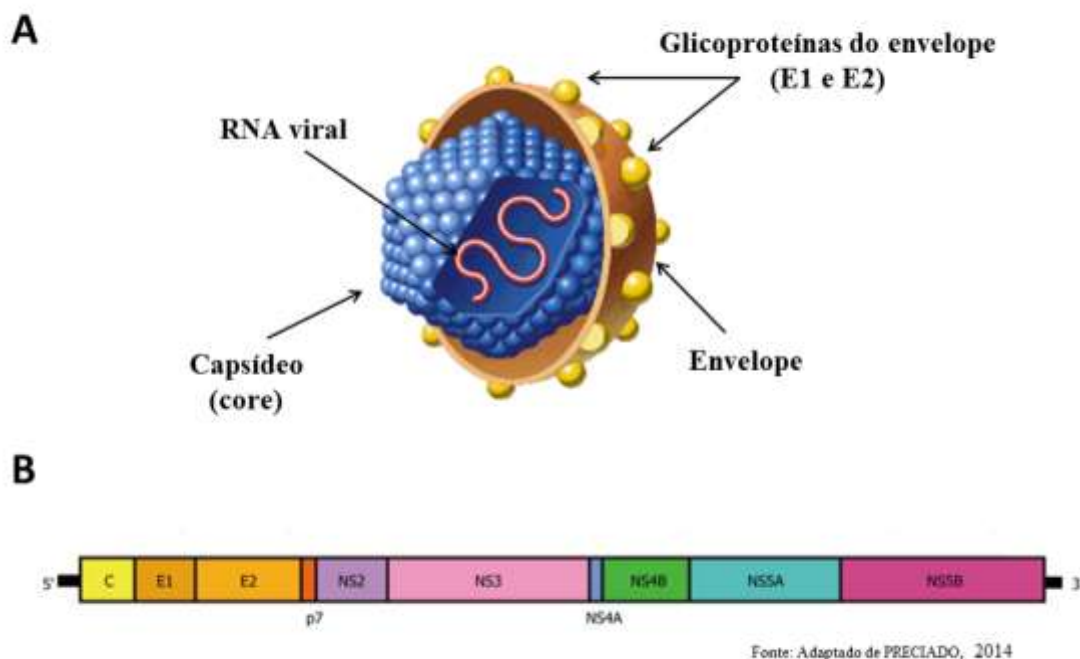
O HCV também pode ser transmitido verticalmente em aproximadamente 5% dos casos e sexualmente em 0,07% ao ano entre casais heterossexuais monogâmicos, porém esses modos de transmissão são muito menos comuns (TERRAULT et al., 2013; WHO, 2016; EINBERG et al., 2017).

1.2. O vírus da hepatite C

O HCV é um vírus envelopado pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*, que possui molécula de RNA fita simples de polaridade positiva com cerca de 10.000 nucleotídeos (CHOO et al., 1991; HOUGHTON, 2002). O envelope, constituído de bicamada lipídica com as glicoproteínas E1 e E2 ancoradas, envolve o nucleocapsídeo,

composto por múltiplas cópias da proteína core (capsídeo) e pelo genoma de RNA (DRUMMER et al., 2003; BARTENSCHLAGER et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2. Esquema tridimensional (A) e genoma (B) do HCV.



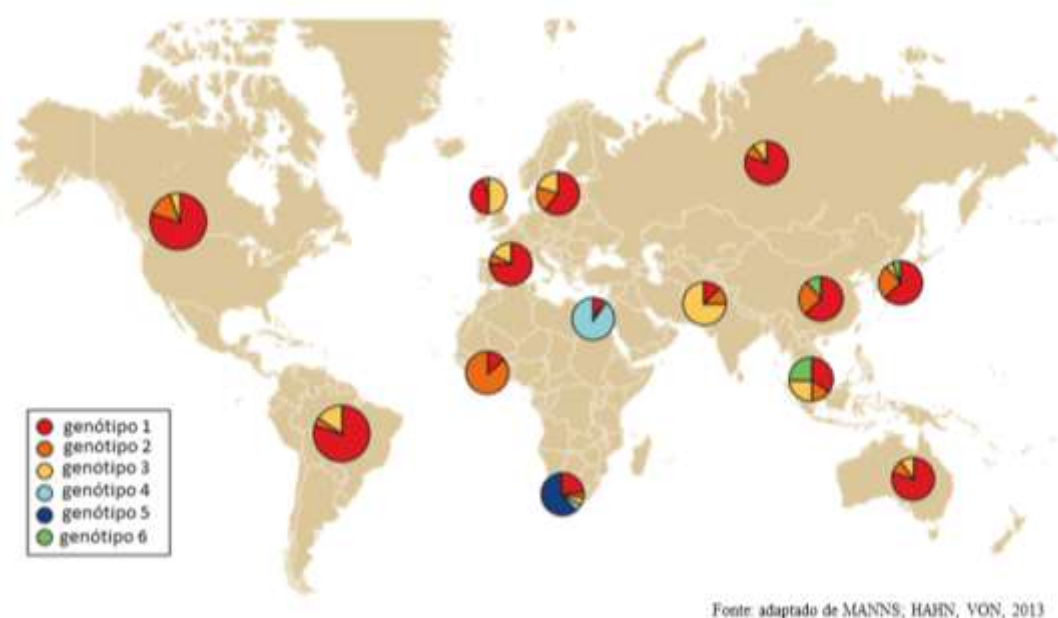
O genoma viral é traduzido em uma poliproteína precursora, que processada resulta nas proteínas estruturais core, E1 e E2, na pequena proteína de canal iônico p7 e nas seis proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (DUGUM; O'SHEA, 2014). Várias das proteínas não estruturais são enzimas e são, portanto, um atraente alvo de drogas antivirais. Estas incluem as duas proteases virais NS2/3 e NS3/4A, a RNA helicase NS3/NTPase, a RNA polimerase dependente de RNA NS5B, e a proteína multifuncional NS5A, envolvida em diferentes estágios do ciclo de vida do HCV, incluindo a replicação do RNA e montagem e liberação do vírion (MANNNS; HAHN, VON, 2013; GAETANO, 2014; SUN et al., 2015).

Até o momento, foram identificados sete genótipos do HCV (MURPHY et al., 2014). Os genótipos 1, 2 e 3 tem distribuição geográfica ampla, enquanto os genótipos 4, 5, 6 e 7 são geralmente limitados a regiões geográficas específicas (HAJARIZADEH et al., 2013; MURPHY et al., 2014) (Figura 3).

O genótipo 1 do HCV é o genótipo mais prevalente no mundo, com 83,4 milhões de casos (46,2% de todos os casos de HCV), seguido pelo genótipo 3, com 54,3 milhões de

casos (30,1%). Os genótipos 2, 4 e 6 representam 22,8% dos casos de HCV e o genótipo 5 contribui com menos de 1%. Para o genótipo 7, identificado pela primeira vez em 2014 na África Central, ainda não existem dados consistentes sobre a sua prevalência e distribuição global (MURPHY et al., 2014). A frequência do genótipo 4 é mais alta da África Central ao Oriente Médio, o genótipo 5 prevalece apenas no sul da África e o genótipo 6 ocorre com maior frequência no Leste e Sudeste Asiático (MESSINA et al., 2015). Os últimos dados do Brasil revelam que o genótipo 1 é o mais prevalente, com 78,4% da população infectada, seguido pelo genótipo 3 (17,9%) (PERONE et al., 2008).

Figura 3. Distribuição genotípica global do HCV.



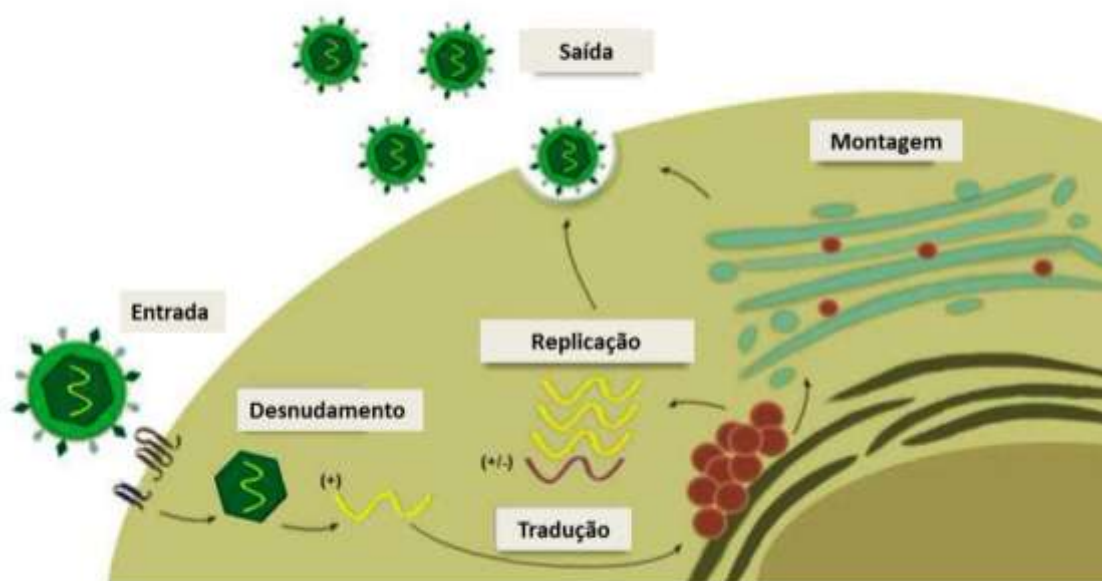
Os genomas completos dos diferentes genótipos diferem em sítios nucleotídicos em pelo menos 30%. Os genótipos 1, 2, 3, 4 e 6 são ainda subdivididos em subtipos, que diferem de 20 a 25% dentro de cada genótipo (SIMMONDS et al., 2005). Existem também variantes genéticas do vírus denominadas quasispécies, que estão altamente relacionadas entre si, diferindo em menos de 10% do genoma viral (ZHOU et al., 2007).

1.3. Ciclo replicativo do HCV

O HCV entra na célula através de endocitose mediada por receptor, que ocorre por uma série de interações entre as glicoproteínas do envelope viral (E1 e E2) com moléculas de superfície celular como glicosaminoglicanos (GAG), grupo de diferenciação 81 (CD81), ocludina (OCLN), claudina-1 (CLDN1), receptores de lipoproteínas de baixa densidade

(LDLR) e receptor de eliminação de classe B tipo I (SR-BI) (BARTENSCHLAGER et al., 2011; BHLER; BARTENSCHLAGER, 2012). Após a entrada ocorre o desnudamento, quando o genoma de RNA de sentido positivo é liberado no citoplasma; neste local ocorre a tradução do RNA do HCV, produzindo uma poliproteína grande (CHOI J., CORDER N. L B., 2015). A poliproteína é então cortada pela protease sinal do hospedeiro e as proteases virais NS2 e NS3/4A geram produtos proteicos individuais, incluindo NS5B, a replicase viral (CHOI J., CORDER N. L B., 2015). Juntos, NS3/4A, NS4B, NS5A e NS5B constituem as proteínas virais da máquina de replicação, que replica o genoma de RNA de sentido positivo através de um intermediário de cadeia negativa, complementar ao genoma (LOHMANN, 2013). Os RNAs de polaridade positiva produzidos podem ser usados para tradução, replicação, ou então ser empacotados para constituir novos vírus (BARTENSCHLAGER et al., 2013; DUBUISSON; COSSET, 2014). As proteínas estruturais se associam (core) ou se integram (E1, E2 e p7) com a membrana do retículo endoplasmático (RE) e formam oligômeros funcionais que promovem a montagem da nova partícula viral. O envelope viral é adquirido por brotamento na membrana do RE e as novas partículas virais são liberadas por meio de via secretora (COUNIHAN et al., 2011; COLLER et al., 2012). A figura 4 representa o ciclo replicativo do HCV.

Figura 4. Ciclo replicativo do HCV.



Fonte: adaptado de CHOI J., CORDER N. L. B., 2015

1.4. Tratamento

O interferon- α foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento de infecções com HCV em 1991, a partir de então, todas as terapias licenciadas no período passaram a incluir alguma forma de interferon- α . As respostas melhoraram em 1998 com a combinação do interferon- α com ribavirina oral, e em 2001 pela associação da molécula de interferon- α com polietileno glicol, produzindo o peginterferon- α (THOMAS, 2013). Para a infecção com o HCV genótipo 1, de maior incidência, um avanço adicional veio em 2011, com a aprovação dos antivirais de ação direta (DAAs) que atuam como inibidores de protease viral, como o telaprevir e o boceprevir, que impedem a protease viral NS3 de clivar as enzimas responsáveis pela replicação viral (KISER et al., 2013; SERRANTI et al., 2014).

A eficiência do tratamento contra o HCV é medido principalmente pela taxa de Resposta Viroológica Sustentada (*Sustained Virological Response*, SVR), definida como ausência de RNA do vírus no sangue dos pacientes ao final do tratamento, e seis meses após o seu término (THOMAS, 2013). No tratamento com peginterferon- α em combinação com ribavirina cerca de 50% dos pacientes com o genótipo 1 do vírus desenvolveram SVR, e com a adição de telaprevir/boceprevir na terapia convencional pegIFN/ribavirina houve um aumento de 20 - 30% (PAN et al., 2012). Apesar de ser clara a eficácia da terapia tripla com telaprevir ou boceprevir, a baixa barreira à resistência continuava a ser uma limitação importante, além dos efeitos colaterais (SERRANTI et al., 2014).

Nos tratamentos baseados em interferon- α e ribavirina são observados efeitos colaterais semelhantes aos sintomas de gripe, anemia e redução do número de plaquetas e leucócitos. Além disso, 19% dos pacientes apresentam efeitos adversos graves como impotência, distúrbios da tireoide, sangramento intestinal, hemólise e anemia. (WOHLFARTH; EFFERTH, 2009). Os efeitos mais graves do telaprevir são erupção cutânea e anemia, e do boceprevir são anemia, perda de paladar, diminuição do número de neutrófilos e desconforto anal (PAN et al., 2012).

Em 2013 foram aprovados dois novos DAAs, o sofosbuvir, um inibidor da polimerase NS5B, e o simeprevir, um inibidor de protease de segunda geração. Esses DAAs são administrados oralmente, em combinação ou não com interferon- α e/ou ribavirina, dependendo do genótipo do vírus (DUGUM; O'SHEA, 2014). Mais recentemente, foram aprovados novos tratamentos com combinações de diferentes DAAs, livres de interferon (HOLMES; THOMPSON, 2015). A combinação de sofosbuvir e daclastavir, inibidor da

NS5A, por exemplo, foi aprovada em 2015 na Europa para os genótipos 1, 2 e 3, e nos EUA para o genótipo 3 (HOLMES; THOMPSON, 2015). Esses tratamentos apresentaram SVR acima de 90% para a maioria dos genótipos e dos pacientes (HOLMES; THOMPSON, 2015).

A bradicardia foi relatada como um efeito colateral após a injeção de sofosbuvir e daclatasvir por pacientes que receberam amiodarona, um medicamento cardíaco, indicando que pacientes tratados com esse medicamento devem ser monitorados (RENET et al., 2015), e um caso de convulsões foi apresentado como possível efeito colateral da terapia antiviral com sofosbuvir e simeprevir (SYAL et al., 2014).

No Brasil, a Comissão Nacional de Incorporação das Tecnologias no SUS (CONITEC) optou por descontinuar o uso dos DAAs de primeira geração (boceprevir e telaprevir) em julho de 2015, e o sofosbuvir, o simeprevir e o daclatasvir foram adicionados ao protocolo terapêutico do SUS (CONITEC, 2015). Em março de 2017, foi adicionado o tratamento com a associação dos fármacos ombitasvir (inibidor de NS5A), dasabuvir (inibidor da polimerase NS5B), veruprevir (inibidor de protease NS3/4A) e ritonavir (potencializador farmacocinético) (CONITEC, 2017).

Terapias baseadas em DAAs custam aproximadamente 84.000 dólares por 12 semanas de tratamento, sendo esses regimes inacessíveis em muitos países (PEARLMAN, 2012; ZHANG et al., 2015). Além disso, estudos tem demonstrado que mutações específicas podem conferir resistência antiviral a esses tratamentos de maneira muito rápida (THOMPSON et al., 2011; TAO et al., 2017).

Os efeitos colaterais, somado ao custo elevado e ao surgimento de variantes virais resistentes aos novos tratamentos, demonstram a necessidade da busca constante por novas terapias anti-HCV.

1.5. Compostos naturais e sintéticos com potencial antiviral

Compostos naturais têm demonstrado considerável potencial no desenvolvimento de produtos terapêuticos, e muitos trabalhos reportaram o uso de compostos extraídos de fontes animais e vegetais como possíveis fármacos, inclusive com atividade antiviral contra o HCV (JIN et al., 2008; YAN et al., 2011; DABBOUSEH; JENSEN, 2013; MATSUMOTO et al., 2013; SHIMIZU, J. F. et al., 2017). Além disso, compostos naturais apresentam características como elevada diversidade química, baixo custo de produção e efeitos colaterais mais leves ou inexistentes (KITAZATO et al., 2007).

6. References

1. **WHO.** *Global hepatitis report, 2017.* 2017.
2. **Emmanuel B, Wilson EM, O'Brien TR, Kottilil S, Lau G.** Shortening the duration of therapy for chronic hepatitis C infection. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;1253:1–5.
3. **Houghton M.** Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int* 2009;29 Suppl 1:82–8.
4. **Choo QL, Kuo G, Weiner a J, Overby LR, Bradley DW, et al.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–62.
5. **Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E.** A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology* 2007;46:623a–623a.
6. **Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, et al.** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962–73.
7. **Welzel TM, Bhardwaj N, Hedskog C, Chodavarapu K, Camus G, et al.** Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J Hepatol* 2016;67:224–236.
8. **Ogholikhan S, Schwarz K.** Hepatitis Vaccines. *Vaccines* 2016;4:6.
9. **Zhang S, Sun F, Ren T, Duan Y, Gu H, et al.** Immunogenicity of an influenza virus-vectored vaccine carrying the hepatitis C virus protein epitopes in mice. *Antiviral Res* 2017;145:168–174.
10. **Li H-C.** Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol* 2015;7:1377.
11. **Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F.** The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:482–496.
12. **Peres-da-Silva A, Brandão-Mello CE, Lampe E.** Prevalence of sofosbuvir resistance-associated variants in Brazilian and world-wide NS5B sequences of genotype-1 HCV. *Antivir Ther.* Epub ahead of print 2017. DOI: 10.3851/IMP3131.
13. **Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, et al.** Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014;370:211–21.
14. **Holmes JA, Thompson AJ.** Interferon-free combination therapies for the treatment of hepatitis C : current insights. 2015;51–70.
15. **Tamori A, Enomoto M, Kawada N.** Recent Advances in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm* 2016;2016:1–11.

16. **Renet S, Chaumais MC, Antonini T, Zhao A, Thomas L, et al.** Extreme Bradycardia after First Doses of Sofosbuvir and Daclatasvir in Patients Receiving Amiodarone: 2 Cases Including a Rechallenge. *Gastroenterology* 2015;149:1378–1380.e1.
17. **Saab S.** Spotlight on grazoprevir – elbasvir once-daily combination and its potential in the treatment of hepatitis C. 2016;2119–2127.
18. **Pawlotsky J.** Hepatitis C Virus Resistance to Antiviral Therapy. *Hepatology* 2016;32:889–896.
19. **Maasoumy B, Vermehren J, Welker MW, Bremer B, Perner D, et al.** Clinical value of on-treatment HCV RNA levels during different sofosbuvir-based antiviral regimens. *J Hepatol* 2016;65:473–482.
20. **Liang TJ.** Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. *Nat Med* 2013;19:869–78.
21. **Newman DJ, Cragg GM.** Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 2016;79:629–661.
22. **Demeunynck M, Charmantray F, Martelli a.** Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2001;7:1703–1724.
23. **Herath HMTB, Müller K, Diyabalanage HVK.** Synthesis of Acrimarins from 1, 3, 5-Trioxxygenated-9-acridone Derivatives. 2004;9:5–10.
24. **Roopan SM, Bharathi A, Al-Dhabi NA, Arasu MV, Madhumitha G.** Synthesis and insecticidal activity of acridone derivatives to *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae and non-target aquatic species. *Sci Rep* 2017;7:39753.
25. **Ions N, Benjamin VPDBWA.** Nonclassical Ions. Von. 1967;1966.
26. **Fernández-Calienes Valdés A.** Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. *Open Med Chem J* 2011;5:11–20.
27. **Sepúlveda CS, Fascio ML, García CC, D ’accorso NB, Damonte EB.** Acridones As Antiviral Agents: Synthesis, Chemical and Biological Properties. *Curr Med Chem* 2013;20:2402–2414.
28. **Yamamoto N, Furukawa H, Ito Y, Yoshida S, Maeno K, et al.** Anti-herpesvirus activity of citrusinine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. *Antiviral Res* 1989;12:21–36.
29. **Chansriniyom C, Ruangrunsi N, Lipipun V, Kumamoto T, Ishikawa T.** Isolation of acridone alkaloids and N-[(4-monoterpenyloxy)phenylethyl]-substituted sulfur-containing propanamide derivatives from *Glycosmis parva* and their anti-herpes simplex virus activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2009;57:1246–1250.
30. **Stankiewicz-Drogoń A, Dörner B, Erker T, Boguszewska-Chachulska AM.** Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibit subgenomic HCV replication. *J Med Chem* 2010;53:3117–3126.
31. **Sepúlveda CS, Fascio ML, Mazzucco MB, Palacios MLD, Pellón RF.** Sepulveda-

- 2008-Synthesis and evaluation of N-s. 9:41–47.
32. **Fujiwara M, Okamoto M, Watanabe M, Machida H, Shigeta S, et al.** Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells. *Antiviral Res* 1999;43:189–99.
 33. **Zarubaev V V., Slita A V., Krivitskaya VZ, Sirotkin AK, Kovalenko AL, et al.** Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro. *Antiviral Res* 2003;58:131–137.
 34. **Sepúlveda CS, García CC, Fascio ML, D'Accorso NB, Docampo Palacios ML, et al.** Inhibition of Junin virus RNA synthesis by an antiviral acridone derivative. *Antiviral Res* 2012;93:16–22.
 35. **Manfroni G, Paeshuyse J, Massari S, Zanolli S, Gatto B, et al.** Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replication by acridone derivatives: Identification of an NS3 helicase inhibitor. *J Med Chem* 2009;52:3354–3365.
 36. **Stankiewicz-Drogon A, Palchykovska LG, Kostina VG, Alexeeva I V, Shved AD, et al.** New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection. *Bioorg Med Chem* 2008;16:8846–52.
 37. **Campos GRF, Bittar C, Jardim ACG, Shimizu JF, Batista MN, et al.** Hepatitis C virus in vitro replication is efficiently inhibited by acridone Fac4. *J Gen Virol* 2017;98:1693–1701.
 38. **Blight KJ, Mckeating J a, Rice CM.** Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* 2002;76:13001–13014.
 39. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
 40. **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, et al.** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791–796.
 41. **Jardim a CG, Igloi Z, Shimizu JF, Santos VAFFM, Felipe LG, et al.** Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antiviral Res* 2014;115:39–47.
 42. **Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, et al.** The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing Ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem* 2003;278:17775–17784.
 43. **Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, et al.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2012;55:720–9.
 44. **Ciesek S, Steinmann E, Wedemeyer H, Manns MP, Neyts J, et al.** Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* 2009;50:1638–1645.
 45. **Belmont P, Dorange I.** Acridine / acridone : a simple scaffold with a wide range.

- Methods* 2008;1211–1224.
46. **Cholewiński G, Dzierzbicka K, Koodziejczyk AM.** Natural and synthetic acridines / acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacol Reports* 2011;7–12.
 47. **Itoigawa M, Ito C, Wu TS, Enjo F, Tokuda H, et al.** Cancer chemopreventive activity of acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 2003;193:133–138.
 48. **Tabarrini O, Manfroni G, Fravolini A, Cecchetti V, Sabatini S, et al.** Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents. *J Med Chem* 2006;49:2621–2627.
 49. **Mazzucco MB, Talarico LB, Vatansever S, Carro AC, Fascio ML, et al.** Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus. *J Biomed Sci* 2015;22:29.
 50. **Nicolle E, Boccard J, Guilet D, Dijoux-Franca MG, Zelefac F, et al.** Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): New inhibitors and QSAR studies by a 3D linear solvation energy approach. *Eur J Pharm Sci* 2009;38:39–46.

CAPÍTULO IV

Conclusão

1. Conclusão

A realização do presente trabalho foi importante para demonstrar novos componentes com atividade antiviral contra o HCV. Compostos isolados de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, bem como acridonas sintéticas, se mostraram com potencial anti-HCV, uma vez que reduziram a infectividade viral.

Os quatro compostos que apresentaram maior inibição TOX1, TOX3, Fac15 e Fac17 apresentaram atividade diretamente nas partículas virais. Adicionalmente, o composto isolado de serpente TOX1 e a acridona Fac15 também apresentaram efeito protetor para as células contra a infecção viral.

Dessa maneira, os compostos com atividade antiviral mais efetiva (TOX1 e TOX3) apresentam potencial para se tornar um medicamento contra a infecção pelo HCV, além da possibilidade de modificação das estruturas químicas das acridonas sintéticas para um possível aumento de seu potencial antiviral.