

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/02/2018.



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

Jacqueline Farinha Shimizu

Atividade antiviral de compostos naturais no ciclo  
replicativo do HCV

São José do Rio Preto

2016

Jacqueline Farinha Shimizu

Atividade antiviral de compostos naturais no ciclo  
replicativo do HCV

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.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina  
Gomes Jardim

São José do Rio Preto

2016

Shimizu, Jacqueline Farinha  
Atividade antiviral de compostos naturais no ciclo replicativo do  
HCV / Jacqueline Farinha Shimizu. -- São José do Rio Preto, 2016.  
114 f. : il.

Orientador: Ana Carolina Gomes Jardim

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Palavra-chave: Virologia. 2. Hepacivirus. 3. Hepatite C. 4.  
Agentes antivirais. 5. Compostos bioativo. I. Jardim, Ana Carolina  
Gomes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

UNESP – Câmpus São José do Rio Preto

Jacqueline Farinha Shimizu

Atividade antiviral de compostos naturais no ciclo replicativo do  
HCV

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.

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Gomes Jardim  
UFU – Uberlândia  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monika Aparecida Coronado  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe  
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
18 de fevereiro de 2016

*Dedico este trabalho aos meus pais, Fátima e Fernando, e ao meu irmão Bruno que sempre acreditaram em mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Gomes Jardim, agradeço pelos ensinamentos, conselhos, por toda atenção, paciência e por sempre ser um motivo de inspiração ao longo dessa jornada.

Às minha co-orientadoras Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Rahal e Dr<sup>a</sup> Cintia Bittar, agradeço pela oportunidade e por todos os conselhos pessoais e profissionais.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Vilela Sampaio, ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Victor Hugo Aquino e ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luís Octávio Regasini pela colaboração no desenvolvimento deste projeto.

À CAPES, agradeço pelo apoio financeiro.

A todos os companheiros do Laboratório de Estudos Genômicos: Bia, Ana Cláudia, André, Bruna, Bruno, Carina, Carol Bonfim, Cíntia, Guilherme, Letícia, Lenira, Stephane, Lucas, Marília, Marina, Miuky, Natalia, Paola, Renata, Rodolfo, Marina Dias, Mônica, Rafael agradeço pela paciência, compreensão, pelas sugestões e amizade.

À UNESP, especialmente aos diversos docentes, direção e administração do IBILCE em especial aos que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal, e que sempre levarei como exemplo ao longo da minha vida.

Ao PET (Programa de Educação Tutorial) agradeço por todos os ensinamentos e pela a oportunidade de ter conhecido pessoas incríveis.

A todos os amigos que fiz durante o curso, agradeço por me mostrarem que a graduação é muito mais do que aprendemos em sala de aula, e por estarem comigo ao longo de todo esse tempo.

A toda a minha família, agradeço pelo amor durante todas as etapas de minha vida.

Agradeço a todas as pessoas que sempre me ajudaram, me apoiaram e acreditaram em mim, sem elas nada disso seria possível.

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”. (Paulo Beleki)*

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**3' NTR** – “Non-translated 3' region”, Região 3' não traduzida

**5' NTR** - “Non-translated 3' region”, Região 5' não traduzida

**bp** – “base pairs”, pares de bases

**C** - Proteína do Core/ capsídeo

**CP** - Crotapotina

**CX** - Crotoxina

**Da** - Daltons

**DAAs** – “Direct-acting antivirals”, Agentes antivirais de ação direta

**E1** - Proteína do Envelope 1

**E2** - Proteína do Envelope 2

**FDA** – “*Food and Drug Administration*” Agência reguladora de medicamentos

**HCV** – “Hepatitis C Virus”, Vírus da Hepatite C

**IRES** – “Internal ribosome entry site”, Sítio interno de entrada ribossomal

**kb** – “Kilobases”

**LD** – “Lipids Droplets”, Gotículas lipídicas

**LDLs** – “Low-density lipoproteins”, Lipoproteínas de baixa

**VLDLs** – “Very-low density lipoproteins”, Lipoproteínas de muito baixa densidade

**NS2** – “Non-structural 2 protein”, Proteína Não-estrutural 2

**NS3** - “Non-structural 3 protein”, Proteína Não-estrutural 3

**NS4A** – “Non-structural 4A protein”, Proteína Não-estrutural 4A

**NS4B** - “Non-structural 4B protein”, Proteína Não-estrutural 4B

**NS5A** - “Non-structural 5A protein”, Proteína Não-estrutural 5A

**NS5B** - “Non-structural 5B protein”, Proteína Não-estrutural 5B

**PEG-IFN** – “Pegylated interferon”- Interferon peguilado

**PLA<sub>2</sub>-CB** – “Phospholipase A<sub>2</sub> – basic chair”, Fosfolipase A<sub>2</sub> – Cadeia básica

**RE** - Retículo Endoplasmático

**RNA** – “Ribonucleic acid”, Ácido ribonucléico

**RVS** - Resposta virológica sustentada

## RESUMO

1 A Hepatite C é uma doença causada pelo vírus da Hepatite C (HCV),  
2 que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Representa um problema  
3 de saúde pública, sendo uma das principais causas de doenças e transplantes  
4 relacionados ao fígado. Não há uma vacina contra o HCV e os tratamentos  
5 atuais não são eficazes para todos os pacientes tratados, apresentando  
6 muitos efeitos colaterais e alto custo de desenvolvimento. Desta forma, fica  
7 evidente a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens  
8 terapêuticas que produzam uma melhor resposta virológica sustentada,  
9 efeitos colaterais mais brandos e menor custo de produção. Neste contexto,  
10 compostos naturais podem fornecer uma fonte alternativa para a identificação  
11 de produtos com potencial terapêutico. O presente trabalho teve como  
12 objetivo avaliar os efeitos de compostos naturais, isolados do veneno da  
13 serpente *Crotalus durissus terrificus* (complexo heterodimérico crotocina e  
14 suas subunidades crotapotina e Fosfolipase A<sub>2</sub>), e do extrato das folhas de  
15 *Pterogyne nitens* (sorbifolina e pedalitina), no ciclo replicativo do HCV *in vitro*.  
16 Estes compostos foram testados quanto às suas atividades antivirais por meio  
17 de infecção e tratamento de células Huh-7.5, e realização de ensaios de  
18 luciferase, western-blotting e imunofluorescência. Os dados obtidos  
19 demonstraram que tanto os compostos isolados de *C. durissus terrificus*  
20 quanto de *P. nitens* possuem efeito anti-HCV, sendo que alguns compostos  
21 inibiram mais de uma etapa do ciclo replicativo viral. Portanto, os múltiplos  
22 efeitos anti-HCV apresentados pelo tratamento com esses compostos  
23 demonstraram o potencial terapêutico de fontes naturais no tratamento da  
24 Hepatite C.

Palavras-chave: vírus da Hepatite C, antivirais, compostos naturais

## **ABSTRACT**

1           *Hepatitis C is a disease caused by Hepatitis C virus (HCV) that*  
2           *affects thousands of people worldwide. Represents a public health problem,*  
3           *being one of the main causes of liver disease and transplantation. There is*  
4           *no vaccine for HCV and the current therapy is not effective for all treated*  
5           *patients, presents many side effects and high cost of development. Thus,*  
6           *there is an evident need to develop new therapeutic approaches which*  
7           *result in a better sustained virologic response, milder side effects and lower*  
8           *production cost. In this context, natural compounds can provide an*  
9           *alternative source for the identification of products with therapeutic potential.*  
10          *This study aimed to evaluate the effects of natural compounds, isolated from*  
11          *Crotalus durissus terrificus venom (heterodimeric complex crotoxin and its*  
12          *subunits crotoxin and phospholipase A<sub>2</sub>), and from leaves extract of*  
13          *Pterogyne nitens (sorbifolin e pedalitin), on HCV life cycle in vitro. These*  
14          *compounds were screened for their antiviral activities by infecting and*  
15          *treating Huh-7.5 cells, and performing luciferase, western blotting and*  
16          *immunofluorescence assays. The data obtained demonstrated that both*  
17          *compounds isolated from Crotalus durissus terrificus and from P. nitens*  
18          *possess anti-, and some compounds inhibited more than one step of the*  
19          *virus life cycle. Therefore, the multiple anti-HCV effects presented by the*  
20          *treatment with these compounds demonstrated the therapeutic potential of*  
21          *natural sources in the treatment of Hepatitis C.*

*Keywords: Hepatitis C Virus, antivirals, natural compounds*

## Sumário

Capítulo I: .....	7
Fundamentação teórica.....	7
1. Introdução.....	9
1.1. Histórico e Patologia.....	9
1.2. O Vírus da Hepatite C .....	9
1.2.1 Ciclo replicativo do HCV.....	13
1.3. Epidemiologia e transmissão.....	16
1.4. Diversidade Genética do HCV.....	18
1.5. Tratamento .....	19
1.6. Compostos naturais com potencial antiviral .....	21
1.6.1. Toxinas animais .....	21
1.6.2. Flavonoides .....	24
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivos específicos .....	27
CAPÍTULO II:.....	28
Multiple effects of toxins isolated from <i>Crotalus durissus terrificus</i> on the hepatitis C virus life cycle .....	28
CAPÍTULO III:.....	54
Natural compounds isolated from <i>Pterogyne nitens</i> inhibit hepatitis C virus entry.....	54
CAPÍTULO IV:.....	90
Natural compounds isolated from brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro.....	90
CAPÍTULO V:.....	100

Conclusões Gerais.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

## **CAPÍTULO I:**

### **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Histórico e Patologia

1           A Hepatite C é uma doença causada pelo vírus da Hepatite C (HCV),  
2 e constitui uma das principais causas de doenças hepáticas, assim como  
3 de transplantes de fígado no mundo (BARTENSCHLAGER; LOHMANN;  
4 PENIN, 2013). Segundo dados recentes aproximadamente 130 a 150  
5 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente. A estimativa é de que  
6 3 a 4 milhões de pessoas são infectadas com o HCV anualmente, e mais  
7 de 500.000 pessoas morrem por doenças no fígado relacionadas à Hepatite  
8 C (W.H.O, 2015).

9           A infecção é caracterizada principalmente pela inflamação do fígado,  
10 apresentando uma fase aguda que pode desenvolver-se em um estado  
11 crônico. Na fase aguda, aproximadamente 15 % dos pacientes conseguem  
12 eliminar a infecção espontaneamente, sendo que os 85 % restante dos  
13 infectados desenvolvem o estado crônico da doença. Em 20 % dos casos  
14 de hepatite C crônica pode haver o desenvolvimento de cirrose após 25 a  
15 30 anos da infecção, e destes, 1 a 5 % podem progredir para falência  
16 hepática devido à cirrose ou ao carcinoma hepatocelular (ASHFAQ et al.,  
17 2011; MORENO-OTERO, 2005; WHO, 2015). A maioria dos pacientes  
18 pode permanecer assintomática em ambas as fases, aguda e crônica, por  
19 anos e só serem diagnosticados durante exames de saúde (RAIMONDI et  
20 al., 2009).

21

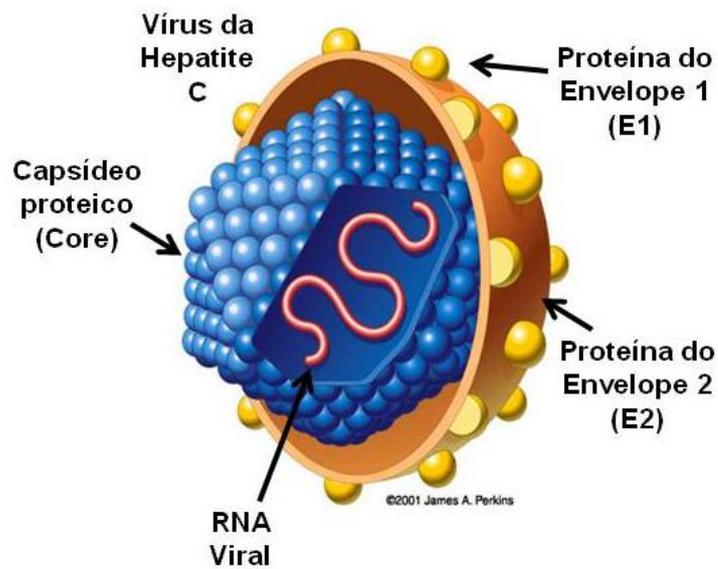
### 1.2. O Vírus da Hepatite C

22           O HCV foi identificado pela primeira vez como agente causador da  
23 Hepatite C em 1989 por Choo e colaboradores (CHOO et al., 1989), o qual  
24 era até então conhecido como vírus da Hepatite não-A e não-B.

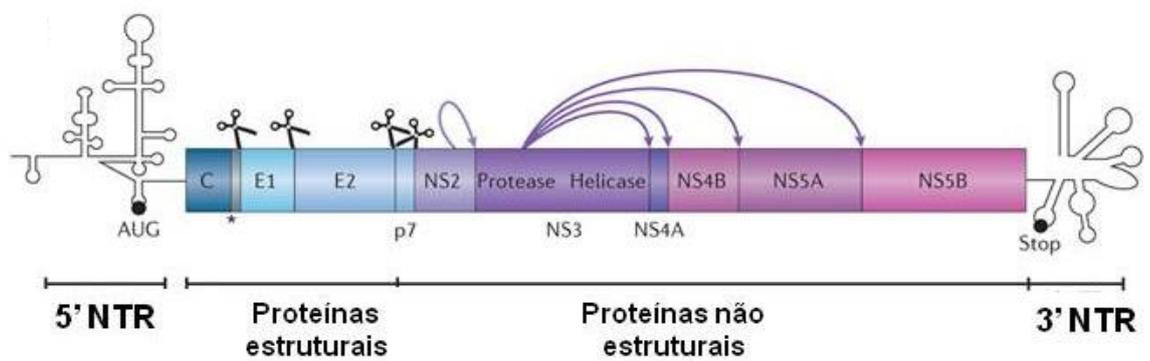
1           Pertencente ao gênero *Hepacivirus* da família Flaviviridae, o HCV  
2 possui como material genômico uma fita simples de RNA de polaridade  
3 positiva de aproximadamente 9600 nucleotídeos (DUBUISSON; COSSET,  
4 2014; SIMMONDS et al., 2005). A partícula viral mede aproximadamente  
5 50 nm, e é formada por um envelope viral derivado das membranas do  
6 hospedeiro, no qual estão inseridas as glicoproteínas E1 e E2 do vírus, um  
7 capsídeo proteico formado pelas proteínas do Core, e o genoma viral  
8 (Figura 1A). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína precursora de  
9 3000 aminoácidos, que é clivada por proteases virais e do hospedeiro em  
10 10 proteínas virais estruturais e não estruturais. Entre as proteínas  
11 estruturais estão as glicoproteínas do envelope E1 e E2, as do capsídeo e  
12 a proteína p7, enquanto entre as não estruturais estão as proteínas NS2,  
13 NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (BARTENSCHLAGER; LOHMANN;  
14 PENIN, 2013; KAITO et al., 1994; TALWANI et al., 2012) (Figura 1B).

**Figura 1:** Partícula viral esquematizada, demonstrando as proteínas do core, do envelope (E1 e E2) e RNA viral – Adaptado de JAMES, 2001 (A). poliproteína viral codificada pelo HCV, demonstrando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus – Adaptado de BARTENSCHLAGER et al., 2013 (B).

(A)



(B)



1 A proteína do capsídeo (C) encontra-se na região mais conservada  
2 do genoma viral e está relacionada com a composição do nucleocapsídeo  
3 viral. Outras funções atribuídas à proteína do Core inclui a modulação da  
4 transcrição de genes, supressão da resposta imune e proliferação celular  
5 (PENIN et al., 2004). Além disso, há evidências que o core pode se associar  
6 a gotículas lipídicas, sendo essencial para recrutar outros componentes  
7 virais importantes na montagem de novas partículas (DUBUISSON;  
8 COSSET, 2014).

9 As proteínas transmembrânicas E1 e E2 são as mais variáveis  
10 dentre as proteínas do HCV. São os principais alvos dos anticorpos  
11 neutralizantes e estão relacionadas com o reconhecimento das células  
12 hepáticas, pelas quais o vírus apresenta tropismo (SIMMONDS, 2013).

13 A viroporina p7 é uma proteína intrínseca de membrana, apresenta  
14 atividade cátion seletiva, sendo essencial para a liberação dos vírions das  
15 células hospedeiras. Juntamente às proteínas do core, E1, E2 e NS2,  
16 formam o módulo de montagem das partículas virais  
17 (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013).

18 As proteínas não estruturais apresentam diferentes funções,  
19 estando associadas principalmente ao processamento da poliproteína  
20 precursora viral, desenrolamento da dupla fita de RNA intermediária, e  
21 patogênese viral. Estas proteínas também formam o complexo de  
22 replicação viral (COUNIHAN; RAWLINSON; LINDENBACH, 2011).

23 A primeira proteína não estrutural NS2 está relacionada à maturação  
24 de outras proteínas virais, e juntamente com a NS3 formam uma cisteino-  
25 protease responsável pela clivagem da região NS2/NS3 (DUBUISSON;  
26 COSSET, 2014; LINDENBACH; RICE, 2005).

27 A NS3 é uma proteína multifuncional, a qual apresenta um domínio  
28 N-terminal serino protease e um domínio C-terminal RNA helicase/NTPase.  
29 Não apresenta um domínio transmembrânico, mas há uma associação

1 desta proteína com a NS4A, que funciona como um cofator. Quando isto  
2 ocorre, a NS3 é encontrada associada ao retículo endoplasmático rugoso  
3 (RE), atuando de maneira importante para formar o complexo replicativo  
4 viral (MUKHERJEE et al., 2012; ROMANO et al., 2012).

5 A proteína NS4A apresenta 54 aminoácidos e, além de atuar como  
6 cofator da NS3, interage com outras proteínas, contribuindo na replicação  
7 do RNA e produção de novas partículas virais (PHAN et al., 2011). Já a  
8 região NS4B possui atividade de GTPase e ATPase, estando também  
9 relacionada com a hiperfosforilação da NS5A e induzindo o RE na formação  
10 de uma estrutura denominada rede membranosa, que facilita a síntese da  
11 fita de RNA positiva (PHAN et al., 2011).

12 Com aproximadamente 450 aminoácidos, a proteína NS5A é  
13 composta por uma  $\alpha$ -hélice anfipática N-terminal e mais 3 domínios  
14 (MACDONALD et al., 2004). Esta proteína é de fundamental importância  
15 no ciclo replicativo viral, regulando várias etapas do processo replicativo,  
16 auxiliando na replicação e montagem, e interagindo tanto com as proteínas  
17 do hospedeiro como com outras proteínas virais (FRIDELL et al., 2011; LIM  
18 et al., 2012). Com isso, esta proteína é um dos principais alvos na busca  
19 de novos tratamentos contra o HCV (NGUYEN et al., 2011; VERDEGEM et  
20 al., 2011).

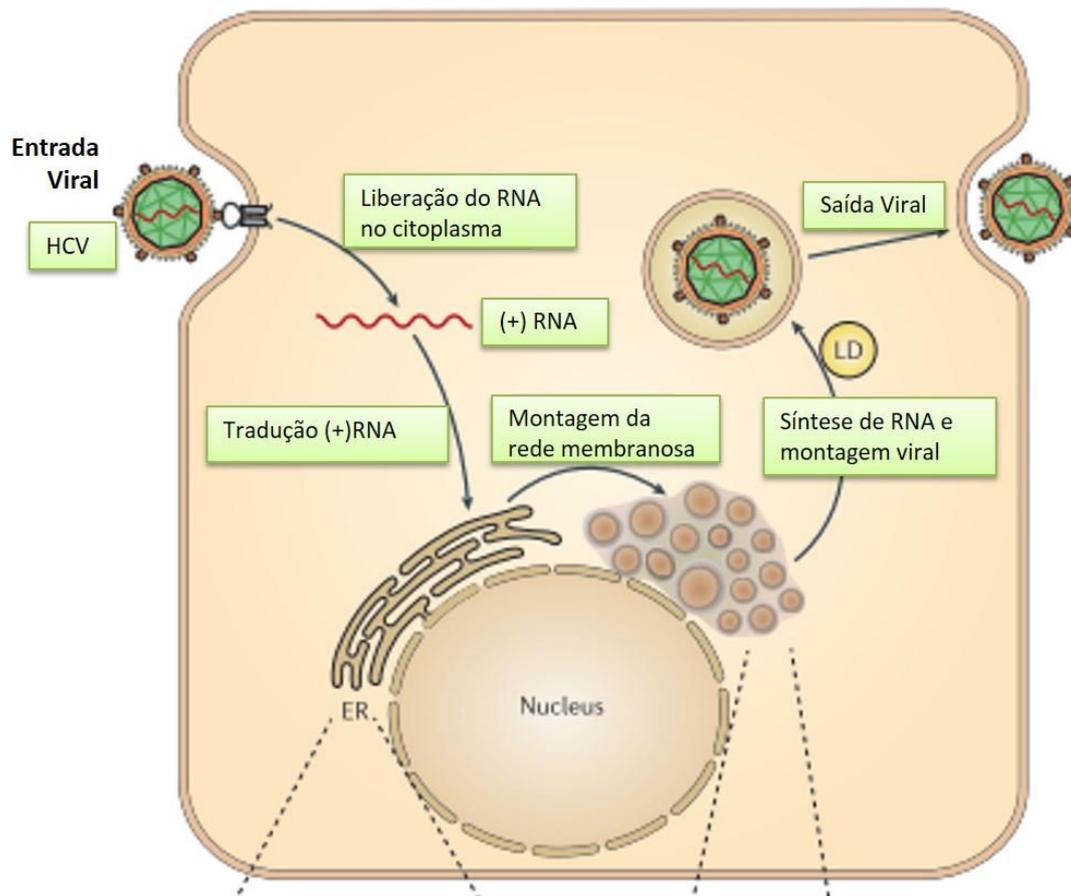
21 A proteína NS5B atua como uma RNA polimerase dependente de  
22 RNA, e está relacionada diretamente com a replicação do material genético  
23 viral que dará origem a novos genomas virais, e estes constituirão  
24 juntamente às proteínas estruturais, novos vírions (CHEN et al., 2012; QIU  
25 et al., 2011).

### **1.2.1 Ciclo replicativo do HCV**

26 As partículas virais do HCV estão associadas a lipoproteínas de  
27 baixa e muito baixa densidade (low-density – LDLs e very-low-density

1 lipoproteins – VLDLs), e esta associação está relacionada à infectividade,  
2 indicando a contribuição dos componentes lipoproteicos para a entrada  
3 eficiente do HCV nas células hospedeiras (ANDRÉ et al., 2002;  
4 BARTENSCHLAGER et al., 2011; LINDENBACH; RICE, 2013). O primeiro  
5 estágio da infecção pelo HCV consiste da ligação do vírus à superfície da  
6 célula hospedeira, pela interação específica entre as glicoproteínas do  
7 envelope viral e receptores celular como CD81, SRB1, CLDN1 e OCLN,  
8 seguido da endocitose mediada por clatrina (ROUILLE et al., 2006; ZEISEL;  
9 FELMLEE; BAUMERT, 2013). Após a entrada do vírus e liberação do  
10 material genético, o sítio interno de entrada ribossomal (Internal ribosome  
11 entry site - IRES) promove a iniciação da tradução da poliproteína, que é  
12 seguido pelo processamento das proteínas virais. As proteínas não  
13 estruturais se associam do lado citoplasmático da membrana do RE onde  
14 interagem entre si e com as proteínas hospedeiras para formar a  
15 maquinaria de replicação viral. Essa maquinaria usa seu próprio genoma  
16 como molde para transcrição de fita complementar negativa de RNA. A fita  
17 negativa ou dupla fita, por sua vez, serve como uma molécula replicativa  
18 intermediária na síntese de novas moléculas de RNA de polaridade positiva  
19 que podem ser usadas para tradução, replicação ou então serem  
20 empacotadas para constituir novos vírions (BARTENSCHLAGER;  
21 LOHMANN; PENIN, 2013; DUBUISSON; COSSET, 2014). As proteínas  
22 estruturais se associam (core) ou se integram com a membrana do retículo  
23 endoplasmático (RE) (E1, E2 e p7) e formam oligômeros funcionais que  
24 promoverão a montagem das novas partículas virais. O envelope viral é  
25 adquirido por brotamento na membrana do RE, processo que parece estar  
26 associado à maquinaria de VLDL, e as novas partículas virais são liberadas  
27 (BERGER et al., 2012; COUNIHAN; RAWLINSON; LINDENBACH, 2011;  
28 HUANG et al., 2007). O esquema do ciclo replicativo do HCV é  
29 representado na figura 2.

**Figura 2:** Ciclo de replicativo do HCV. A fita de RNA positivo é liberada no citoplasma, interagindo com o retículo endoplasmático (RE) para a tradução da fita e formação dos complexos replicativos, estes complexos se associam com membranas derivadas do RE formando a rede membranosa. Para a formação de novos vírions o (+)RNA é direcionado para gotículas lipídicas (LD) para serem empacotados e depois liberados. Adaptado de Li et al., 2015



### 1.3. Epidemiologia e transmissão

1           A distribuição do HCV é bem ampla. Sua maior prevalência está  
2 localizada na África e no Oriente Médio, podendo chegar em até 10%.  
3 Além disso, a região asiática em números absolutos apresenta  
4 aproximadamente 50% da população mundial de infectados pelo HCV.  
5 (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013) (Figura 3).

6           A principal via de transmissão do HCV é por exposição percutânea  
7 de sangue e derivados do plasma, sendo a utilização de agulhas e  
8 seringas contaminadas uma das principais fontes de transmissão,  
9 principalmente em usuários de drogas (WHO, 2015). Até o final da  
10 década de 80, quando o HCV ainda não havia sido identificado, a principal  
11 via de transmissão ocorria por transfusões sanguíneas. Em países  
12 desenvolvidos, o aumento da incidência do HCV está relacionado há um  
13 aumento do número de usuários de drogas (HAJARIZADEH; GREBELY;  
14 DORE, 2013; WANDELER et al., 2015).

15           A transmissão por meios de procedimentos como a colocação  
16 piercings, tatuagens, agulhas de acupuntura e técnicas utilizadas por  
17 manicure e pedicure também foram documentadas como fator de risco  
18 para infecção por HCV (CONITEC, 2015; LEMOS et al., 2014). Há  
19 também relatos de transmissão perinatal do HCV entre crianças recém-  
20 nascidas e mães infectadas (ATTALLAH et al., 2015; GARCIA-TEJEDOR  
21 et al., 2015; OHTO et al., 1994). Existem poucas evidências de que o  
22 semêm, saliva, lágrimas e urina estejam relacionados com a transmissão  
23 do vírus, embora o RNA viral tenha sido encontrado nesses fluídos  
24 (SIMMONDS, 2013).



#### 1.4. Diversidade Genética do HCV

1 O HCV apresenta alta variabilidade genética, sendo possível  
2 diferenciar 7 genótipos, com aproximadamente 30% de diferenças entre as  
3 sequências nucleotídicas (MURPHY et al., 2007). Segundo um estudo  
4 realizado por SIMMONDS (2013), os genótipos 1, 2 e 3 apresentam uma  
5 distribuição mais ampla, enquanto os demais estão relacionados a regiões  
6 geográficas específicas. O genótipo 1 é o mais abrangente  
7 geograficamente, sendo o mais comum na América do Norte, no Oeste e  
8 Norte da Europa, América do Sul, Ásia e Austrália (HAJARIZADEH;  
9 GREBELY; DORE, 2013). O genótipo 2 é mais comum no oeste da África,  
10 o genótipo 3 no sul e sudeste asiático, o genótipo 4 na África central e  
11 Oriente Médio, o genótipo 5 é quase exclusivamente encontrado no sul da  
12 África e o genótipo 6 no sudeste asiático. O genótipo 7 foi descoberto  
13 recentemente (MURPHY et al., 1996; SIMMONDS, 2004, 2013) (Figura 3).

14 Estes 7 genótipos estão divididos em 70 subtipos que apresentam  
15 uma variação de 20 a 25% nas sequências nucleotídicas, sendo os  
16 subtipos mais frequentes são 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a e 6a (SIMMONDS,  
17 2013). Existem também variantes genéticas do vírus denominadas  
18 quasiespécies, que estão altamente relacionadas entre si, diferindo em  
19 menos de 10% do genoma viral (DOMINGO et al., 2006; MARTELL et al.,  
20 1992; ZHOU et al., 2007).

21 A variação nas quasispecies representa um grande problema para os  
22 indivíduos infectados, devido às implicações do potencial adaptativo do  
23 HCV (GALE; FOY, 2005). Tal variabilidade genética, juntamente a outros  
24 fatores virais e do hospedeiro, pode estar relacionada aos diferentes níveis  
25 de virulência, uma vez que alguns genótipos parecem estar associados a  
26 patologias mais graves, e também a maiores taxas de escape, podendo  
27 levar à resistência ao tratamento (THIMME; BINDER;  
28 BARTENSCHLAGER, 2012).

## 1.5. Tratamento

1 Não existe atualmente uma vacina contra o HCV, os estudos para o  
2 desenvolvimento de vacinas e outras abordagens como o uso de RNAs de  
3 interferência, apesar dos grandes avanços, ainda se encontra em fases de  
4 estudo, não sendo aprovada a utilização em humanos (JAHAN et al., 2011;  
5 KHALIQ et al., 2010; SWADLING; KLENERMAN; BARNES, 2013).

6 Os métodos utilizados no tratamento não apresentam resultados  
7 eficazes para todos os pacientes tratados (POVEDA et al., 2014). O  
8 Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) foi o primeiro medicamento utilizado no tratamento de  
9 pacientes com hepatite C crônica, mas foi efetivo apenas em uma parcela  
10 dos indivíduos (JAECKEL et al., 2001). Com a introdução da ribavirina, o  
11 tratamento combinado apresentou uma taxa de resposta virológica  
12 sustentada (RVS) de 35 a 40 %, sendo de 29 % para pacientes infectados  
13 com o genótipo 1 após 48 semanas de terapia, e 70 % para os genótipos 2  
14 e 3 após 24 semanas de tratamento (DEUTSCH; HADZIYANNIS, 2008;  
15 JAECKEL et al., 2001; POYNARD et al., 1998, 2003).

16 Posteriormente, sugeriram tratamentos à base de Interferons  
17 modificados pela adição de uma molécula de polietileno glicol (PEG-IFN).  
18 A adição dessa molécula retarda a eliminação do IFN possibilitando que  
19 esse se mantenha em uma concentração estável no sangue, e juntamente  
20 com a ribavirina, apresentaram melhores resultados. Em estudos com  
21 pacientes cronicamente infectados, a taxa de RVS foi de 76 a 84 % em  
22 pacientes com infecção pelo genótipo 2 ou 3, e de 42 a 52% em pacientes  
23 infectados com HCV do genótipo 1 (KLENERMAN; FLEMING; BARNES,  
24 2009; ZEUZEM, 2008).

25 Na busca por tratamentos mais eficientes contra o HCV, o uso de  
26 agentes antivirais de ação direta (DAAs), que tem como alvo as proteínas  
27 virais como a NS5A e NS3-4A, demonstraram um potencial na inibição da  
28 replicação viral (WOHLFARTH; EFFERTH, 2009). Em 2011, a agência  
29 reguladora de medicamentos dos Estados Unidos (FDA - Food and Drug

1 Administration) aprovou o uso dos inibidores de protease NS3-4A,  
2 Boceprevir e o Telaprevir, associados à terapia com interferon e ribavirina  
3 no tratamento de pacientes do genótipo 1, elevando para 90% a taxa de  
4 RVS (NAGGIE, 2012).

5 No Brasil, o governo aprovou recentemente a utilização dos DAAs de  
6 segunda geração Simeprevir e Daclastavir para o tratamento da hepatite C.  
7 Estes DAAs estão sendo distribuídos desde outubro de 2015 para o  
8 tratamento no Sistema Único de Saúde (SUS) (CONITEC, 2015). A  
9 segunda geração de DAAs apresenta efeitos colaterais mais brandos e um  
10 menor tempo de tratamento (WYLES, 2013). Entretanto, a combinação  
11 desses antivirais empregados no tratamento dependerá dos genótipos dos  
12 pacientes e, em alguns casos, poderão ser adicionais à terapia com  
13 interferon e ribavirina (CONITEC, 2015).

14 Apesar dos tratamentos mais recentes baseados em DAAs  
15 apresentarem melhores taxas de RSV e uma duração menor de tratamento  
16 (aproximadamente 12 semanas), alguns estudos já demonstraram que  
17 mutações específicas podem conferir resistência viral a estes tratamentos  
18 (BARTH, 2015; POVEDA et al., 2014; THOMPSON; LOCARNINI; BEARD,  
19 2011). Além disso, apresentam custos de produção muito elevados, mesmo  
20 com a diminuição do tratamento para 12 semanas, limitando o uso em  
21 países subdesenvolvidos. Estes países ainda utilizam terapias como o  
22 Interferon convencional combinado à ribavirina para tratar pacientes  
23 infectados com genótipos menos agressivos, sendo os tratamentos mais  
24 recentes aplicados apenas para o genótipo 1. Adicionalmente, os  
25 tratamentos existentes também demonstram uma série de efeitos colaterais  
26 para os pacientes tratados. Tais fatos tornam necessária a busca por novos  
27 métodos de intervenção para o tratamento da Hepatite C.

28

## 1.6. Compostos naturais com potencial antiviral

1           Apesar dos recentes avanços no tratamento para Hepatite C, ainda  
2 existem muitos desafios a serem vencidos. É inerente a necessidade do  
3 desenvolvimento de novas terapêuticas, e neste contexto, compostos  
4 naturais podem servir como alternativas para o desenvolvimento de novas  
5 abordagens anti-HCV. Muitos trabalhos reportaram o uso de compostos  
6 extraídos de fontes naturais animais e vegetais como possíveis agentes  
7 terapêuticos, inclusive com atividade antiviral contra o HCV (JIN et al.,  
8 2008; MATSUMOTO et al., 2013; YAN et al., 2011); DABBOUSEH;  
9 JENSEN, 2013).

10

### 1.6.1. Toxinas animais

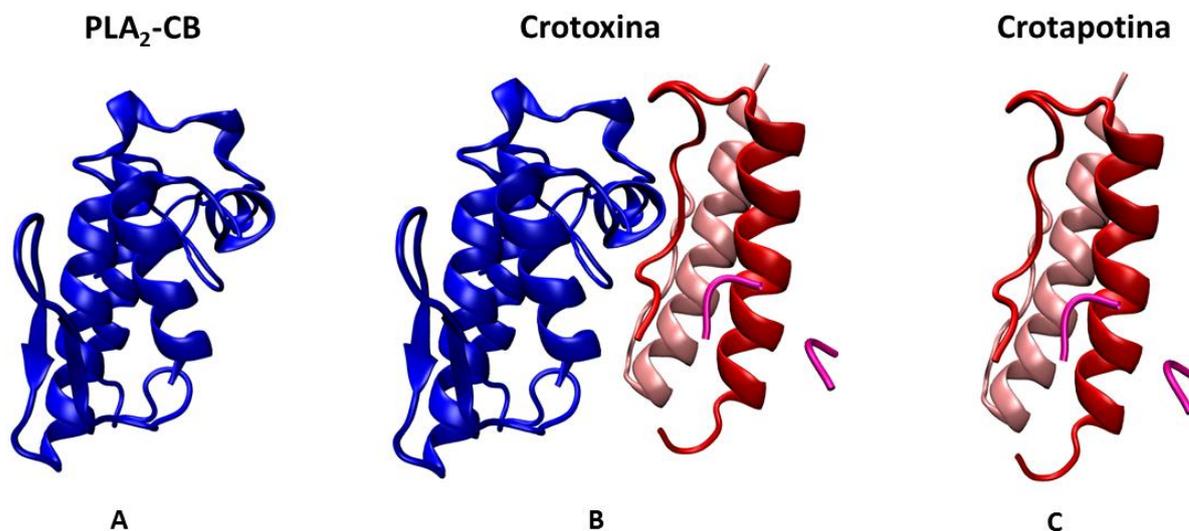
11           Toxinas isoladas de animais como serpentes peçonhentas vêm  
12 sendo amplamente estudadas com relação a suas aplicações (BISWAS et  
13 al., 2012; BORDON et al., 2012; KOH; KINI, 2012;  
14 MEENAKSHISUNDARAM; SWENI;  
15 THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN, 2009; MULLER et al., 2014;  
16 SANT'ANA et al., 2008). Venenos de serpente contém uma mistura de  
17 compostos bioativos como proteínas e polipeptídios que apresentam uma  
18 alta atividade metabólica. Estes compostos podem existir na forma de  
19 monômeros ou formar complexos (FAURE; SAUL, 2012; LEE, 1972).

20           O primeiro componente purificado e cristalografado de um veneno  
21 animal foi a crotoxina, um componente do veneno de *Crotalus durissus*  
22 *terrificus* (Slotta K, 1938). Esta proteína é formada por um complexo  
23 heterodimérico que apresenta atividades imunomoduladora, anti-  
24 inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e analgésica documentadas (Yan,  
25 2006; Zhu, et al., 2008; Sampaio, 2006; Sampaio, 2010). Outros complexos  
26 isolados de venenos de serpente também vêm sendo estudados quanto a  
27 suas atividades (Doley, 2009). Alguns destes, inclusive a crotoxina, vêm

1 sendo investigados quanto a sua atividade antiviral (CECILIO et al., 2013;  
2 MARCUSSI et al., 2011; MEENAKSHISUNDARAM; SWENI;  
3 THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN, 2009).

4 Dennis et al. (2011) demonstraram que a crotoxina (CX) é um  
5 heterodímero composto por subunidades, denominadas de crotapotina  
6 (CP) e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>-CB), ligadas não covalentemente (Figura 4).  
7 Podem ser encontradas 4 isoformas de cada subunidade, que diferem na  
8 sequência dos aminoácidos apenas em 8 resíduos, sendo então a CX uma  
9 mistura de variantes formadas pela combinação das diferentes isoformas.  
10 A subunidade PLA<sub>2</sub>-CB apresenta um caráter básico e peso molecular de  
11 aproximadamente 16.400 Da. Dentre os vários tipos de fosfolipases, a  
12 PLA<sub>2</sub>-CB trata-se de uma fosfolipase secretada (sPLA<sub>2</sub>), do grupo GIIA,  
13 pertencente a super família das fosfolipases A<sub>2</sub> (FAURE et al., 1993; KINI,  
14 2003; DENNIS et al., 2011). Já a subunidade CP apresenta caráter ácido,  
15 com peso molecular de aproximadamente 9.000 Da. É formada por três  
16 cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) unidas por ligações dissulfeto, originadas da  
17 clivagem de seu precursor, a pró-crotapotina. A CP age com uma  
18 chaperona impedindo a subunidade PLA<sub>2</sub>-CB de se ligar a sítios não  
19 específicos, ao mesmo tempo em que a direciona para os sítios alvo  
20 (DOLEY; KINI, 2009; HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; MULLER et  
21 al., 2012). Estudos com o complexo CX e suas subunidades, realizados por  
22 Radvanyi et al., em 1985, concluíram que a subunidade PLA<sub>2</sub>-CB só foi  
23 tóxica quando combinada com outra subunidade PLA<sub>2</sub>-CB, formando um  
24 dímero PLA<sub>2</sub>-CB-PLA<sub>2</sub>-CB.

**Figura 4.** Estrutura em cristal do complexo crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. A subunidade básica (PLA<sub>2</sub>-CB) é mostrada em azul (A). O complexo crotoxina com suas duas subunidades (B). A subunidade ácida (crotopotina) é mostrada em vermelho, rosa e rosa claro (PDB, 3R0L).



1           Dentre a diversidade de aplicações para compostos extraídos de  
 2 animais, foi identificada atividade inibitória no ciclo replicativo de diferentes  
 3 vírus, apresentando uma taxa considerável de inibição da replicação de  
 4 vírus da família Flaviviridae (MULLER et al., 2012; PARIDA et al., 2002;  
 5 YAN et al., 2011). O complexo CX demonstrou efeito inibitório contra vírus  
 6 da febre amarela e o da dengue (MULLER et al., 2012). Alguns compostos  
 7 encontrados em venenos animais como a fosfolipase A2 (PLA-2) (FENARD  
 8 et al., 1999) e a Mucroporin-M1 também demonstraram atividade inibitória  
 9 contra HCV, vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), coronavírus  
 10 associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), vírus da  
 11 influenza aviária (H5N1) e vírus do sarampo (LI et al., 2011; PETRICEVICH;  
 12 MENDONÇA, 2003; XING et al., 2012; YAN et al., 2011).

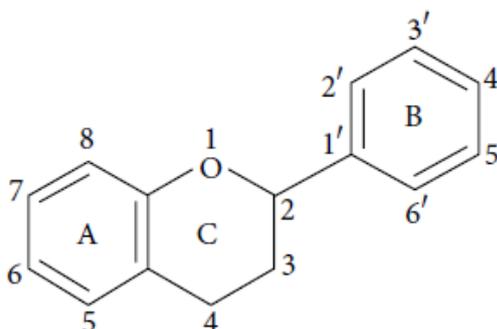
13           Com isso, a utilização de toxinas extraídas de serpentes peçonhentas  
 14 como alternativa para o desenvolvimento de novos antivirais vem sendo  
 15 estudadas para outros vírus. Porém, pouco se sabe sobre a ação destas  
 16 toxinas no ciclo replicativo do HCV.

### 1.6.2. Flavonoides

1 Os flavonoides são uma classe importante de compostos naturais que  
2 apresentam vários benefícios à saúde, sendo utilizados na medicina.  
3 Muitos são descritos na literatura com atividade antioxidante  
4 (LEOPOLDINI et al., 2006), anti-inflamatória (SERAFINI; PELUSO;  
5 RAGUZZINI, 2010), hepatoprotetora (ZHU et al., 2012), anticancerígena  
6 (YI et al., 2005), e atividade antiviral, como a silibina (BLAISING et al.,  
7 2013), a epigalo-catequina-3-galato (CALLAND et al., 2012a), e a  
8 naringenina (GOLDWASSER et al., 2011; LYU; RHIM; PARK, 2005;  
9 NAHMIAS et al., 2008).

10 Quimicamente os flavonoides são compostos por um esqueleto de 15  
11 carbonos, consistindo de 2 anéis benzênicos (A e B) ligados via anel  
12 pirano heterocíclico (C) (Figura 5). As várias classes de flavonoides  
13 diferem no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C  
14 (MIDDLETON, 1998).

**Figura 5.** Estrutura básica de um flavonoide. Fonte: KUMAR; PANDEY, 2013

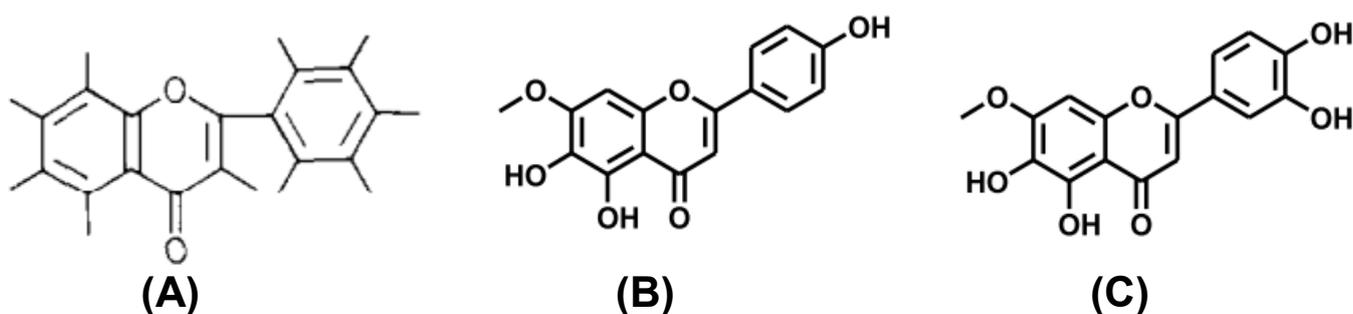


15 Dentro da classe dos flavonoides existe a subclasse das flavonas  
16 (Figura 6A), a qual demonstrou apresentar atividades antioxidante  
17 (FERNANDES et al., 2008), antibacteriana contra *Helicobacter pylori*  
18 (ISOBE et al., 2006), proteção contra danos ao DNA e inibição da

1 peroxidação lipídica (LIU et al., 2006). E em estudos computacionais  
 2 apresentou atividade antiviral contra integrase de HIV-1 (LAMEIRA et al.,  
 3 2006) e anti-Picornavirus (SOUZA et al., 2004).

4 As flavonas pedalitina (Figura 6B) e sorbifolina (Figura 6C) são  
 5 metabólitos secundários que pertencem à classe dos flavonoides, já  
 6 isoladas em algumas espécies de plantas, como *Ruellia tuberosa* (LIN et  
 7 al., 2006), *Mentha pulegium* e *Mentha suaveolens* (ZAIDI et al., 1998b).  
 8 São descritas na literatura com atividades antibacteriana (ISOBE;  
 9 NAGATA, 2010), antioxidante (FERNANDES et al., 2008; MASUOKA;  
 10 ISOBE; KUBO, 2006) e anticancerígena (NITODA; ISOBE; KUBO, 2008),  
 11 demonstrando um grande potencial de atividades biológicas. Porém,  
 12 ainda não são descritas na literatura atividades antivirais para estes  
 13 compostos.

**Figura 6.** Estrutura básica de uma flavona (A). Estrutura da Pedalitina (B) e Sorbifolina (C). Adaptado de HAVSTEEN, 1983; REGASINI, 2015.



14 A utilização de medicamentos à base de plantas é uma prática antiga,  
 15 sendo que muitos compostos naturais e seus derivados vêm sendo  
 16 utilizados como medicamentos (BALUNAS; KINGHORN, 2005). O ácido  
 17 acetil-salicílico e a penicilina são exemplos clássicos desse uso  
 18 (BUTLER, 2004).

1 Muitos compostos naturais extraídos de plantas são descritos com  
2 enorme potencial terapêutico, apresentando diversas atividades como  
3 anticâncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010), antimalárica (VAN AGTMAEL;  
4 EGGELTE; VAN BOXTEL, 1999) e antidepressiva (CÍCERO BEZERRA  
5 FELIPE et al., 2007). Também são descritos na literatura compostos com  
6 uma taxa considerável de inibição da replicação de vírus da família  
7 Flaviviridae, incluindo a atividade anti-HCV (BALUNAS; KINGHORN,  
8 2005; PARIDA et al., 2002). Jardim *et al.*, identificou uma potente  
9 atividade antiviral em compostos extraídos de plantas brasileiras sobre a  
10 replicação do HCV (JARDIM et al., 2015), corroborando com outros  
11 trabalhos, e demonstrando que a utilização de flavonoides extraídos de  
12 plantas como alternativa na terapia para o tratamento do HCV vem sendo  
13 amplamente estudada (CALLAND et al., 2012b).

14 Cerca de 40 novos medicamentos de origem natural foram lançados  
15 no mercado entre os anos de 2000 e 2010 (BRAHMACHARI, 2012). Neste  
16 contexto, a utilização de compostos naturais de fontes animais ou  
17 vegetais já demonstrou diversas atividades descritas na literatura, dentre  
18 elas a atividade antiviral, podendo ser considerados fontes promissoras  
19 para descobertas de futuros antivirais e resultar na melhoria do  
20 tratamento da Hepatite C.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Compostos naturais isolados de diferentes origens possuem atividade antiviral no ciclo replicativo do HCV.
- A análise da atividade dos compostos no ciclo replicativo viral demonstrou que um composto natural pode agir em mais de uma etapa do ciclo realizada pelo vírus durante a infecção das células hospedeiras.
- Os compostos isolados de *C. durissus terrificus* apresentaram inibição das etapas de entrada, replicação e liberação do HCV.
- Os compostos isolados de *P. nitens* apresentaram efeito na entrada dos vírus nas células hospedeiras, por mecanismos de ação direta nas partículas virais e/ou por efeito protetor ainda não elucidado nas células hospedeiras.
- Compostos naturais podem ser úteis para investigar as interações do HCV com as células hospedeiras, bem como no desenvolvimento de futuras terapias para o tratamento da hepatite C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANDRÉ, P. et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C  
2 virus RNA-containing particles. **Journal of virology**, v. 76, n. 14, p. 6919–  
3 6928, 2002.
- 4 ASHFAQ, U. et al. An overview of HCV molecular biology, replication and  
5 immune responses. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 161, 2011.
- 6 ATTALLAH, A. M. et al. Perinatal transmission of hepatitis C antigens:  
7 envelope 1, envelope 2 and non-structural 4. **Infectious Diseases**, v. 47,  
8 n. 8, p. 568–574, ago. 2015.
- 9 BALUNAS, M.; KINGHORN, A. Drug discovery from medicinal plants. **Life**  
10 **sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.
- 11 BARTENSCHLAGER, R. et al. **Assembly of infectious hepatitis C virus**  
12 **particles****Trends in microbiology**Elsevier Trends Journals, , 1 fev. 2011.  
13 Disponível em:  
14 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X1000199X>>
- 15 BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F. The molecular and  
16 structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection.  
17 **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 482–496, 10 jun. 2013.
- 18 BARTH, H. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives  
19 and challenges for the next decade. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n.  
20 5, p. 725, 2015.
- 21 BERGER, K. L. et al. **Molecular Determinants and Dynamics of Hepatitis**  
22 **C Virus Secretion****PLoS Pathogens**, 2012.
- 23 BISWAS, A. et al. Nanoparticle-conjugated animal venom-toxins and their  
24 possible therapeutic potential. **Journal of venom research**, v. 3, p. 15–21,  
25 2012.
- 26 BLAISING, J. et al. Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes

- 1 by hindering clathrin-dependent trafficking. **Cellular microbiology**, v. 15, n.  
2 11, p. 1866–82, nov. 2013.
- 3 BORDON, K. et al. Isolation, enzymatic characterization and  
4 antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase  
5 from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740–  
6 2748, 2012.
- 7 BRAHMACHARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Impacts and  
8 Opportunities—An Assessment. **Bioactive Natural Products:  
9 Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**, p. 1–199, 2012.
- 10 BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery.  
11 **Journal of natural products**, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.
- 12 CALLAND, N. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of  
13 hepatitis C virus entry. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 55, n. 3, p. 720–9,  
14 2012a.
- 15 CALLAND, N. et al. Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral  
16 approach? **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2197–2217, 2012b.
- 17 CECILIO, A. B. et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49  
18 phospholipases A2 from snake venom and their antiviral activities against  
19 Dengue virus. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1780–1798, 2013.
- 20 CHEN, K. et al. A novel class of highly potent irreversible hepatitis C virus  
21 NS5B polymerase inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 5,  
22 p. 2089–2101, 2012.
- 23 CHOO, Q. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-  
24 A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359–362, 1989.
- 25 CÍCERO BEZERRA FELIPE, F. et al. Piplartine, an amide alkaloid from  
26 *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice.  
27 **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and  
28 phytopharmacology**, v. 14, n. 9, p. 605–612, 2007.

- 1 CONITEC. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e  
2 Coinfecções. 2015.
- 3 COSTA-LOTUFO, L. V et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como  
4 Fonte de Novos Fármacos Anticâncer : Estudos no Laboratório Nacional de  
5 Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará The  
6 Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs :  
7 Studies Carr. v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.
- 8 COUNIHAN, N. A.; RAWLINSON, S. M.; LINDENBACH, B. D. **Trafficking**  
9 **of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly****PLoS**  
10 **Pathogens**, 2011.
- 11 DABBOUSEH, N.; JENSEN, D. Future therapies for chronic hepatitis C.  
12 **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 5, p. 268–276,  
13 2013.
- 14 DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A 2 Enzymes: Physical Structure,  
15 Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and  
16 Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185,  
17 12 out. 2011.
- 18 DEUTSCH, M.; HADZIYANNIS, S. J. Old and emerging therapies in chronic  
19 hepatitis C: an update. **J Viral Hepat**, v. 15, p. 2–11, 2008.
- 20 DOLEY, R.; KINI, R. Protein complexes in snake venom. **Cellular and**  
21 **molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 17, p. 2851–2871, 2009.
- 22 DOMINGO, E. et al. Viruses as quasispecies: biological implications.  
23 **Current topics in microbiology and immunology**, v. 299, p. 51–82, 2006.
- 24 DUBUISSON, J.; COSSET, F.-L. Virology and cell biology of the hepatitis C  
25 virus life cycle – An update. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S3–S13,  
26 nov. 2014.
- 27 FAURE, G. et al. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of  
28 the complex plays a major role in its pharmacological action. **Eur J**

- 1 **Biochem**, v. 214, n. 2, p. 491–496, 1993.
- 2 FAURE, G.; SAUL, F. Crystallographic characterization of functional sites  
3 of crotoxin and ammodytoxin, potent  $\beta$ -neurotoxins from Viperidae venom.  
4 **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v.  
5 60, n. 4, p. 531–538, 2012.
- 6 FENARD, D. et al. Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV  
7 inhibitors that block virus entry into host cells. **J Clin Invest**, v. 104, n. 5, p.  
8 611–618, 1999.
- 9 FERNANDES, D. C. et al. Myeloperoxidase inhibitory and radical  
10 scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chemical &**  
11 **pharmaceutical bulletin**, v. 56, n. 5, p. 723–726, 2008.
- 12 FRIDELL, R. A et al. Distinct functions of NS5A in hepatitis C virus RNA  
13 replication uncovered by studies with the NS5A inhibitor BMS-790052.  
14 **Journal of virology**, v. 85, n. 14, p. 7312–7320, 2011.
- 15 GALE, M.; FOY, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C  
16 virus. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 939–945, 18 ago. 2005.
- 17 GARCIA-TEJEDOR, A. et al. Risk factors for vertical transmission of  
18 hepatitis C virus: a single center experience with 710 HCV-infected mothers.  
19 **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive**  
20 **Biology**, v. 194, p. 173–177, nov. 2015.
- 21 GOLDWASSER, J. et al. Naringenin inhibits the assembly and long-term  
22 production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated  
23 mechanism. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 5, p. 963–971, nov. 2011.
- 24 HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural  
25 history of HCV infection. **Nature Reviews Gastroenterology &**  
26 **Hepatology**, v. 10, n. 9, p. 553–562, 2 jul. 2013.
- 27 HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high  
28 pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p.

- 1 1141–1148, abr. 1983.
- 2 HENDON, R. A; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological Roles of the Two  
3 Components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of**  
4 **Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560–1563, 1 jul. 1971.
- 5 HUANG, H. et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes  
6 dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins.  
7 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**  
8 **of America**, v. 104, p. 5848–5853, 2007.
- 9 ISOBE, T. et al. The anti-Helicobacter pylori flavones in a Brazilian plant,  
10 Hyptis fasciculata, and the activity of methoxyflavones. **Biological &**  
11 **pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 5, p. 1039–41, maio 2006.
- 12 ISOBE, T.; NAGATA, K. [Study on the antibacterial activity of compounds  
13 from the isodon species]. **Yakugaku zasshi: Journal of the**  
14 **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 130, n. 3, p. 447–50, mar. 2010.
- 15 JAECKEL, E. et al. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. **N**  
16 **Engl J Med**, v. 345, p. 1452–1457, 2001.
- 17 JAHAN, S. et al. HCV entry receptors as potential targets for siRNA-based  
18 inhibition of HCV. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 15, 2011.
- 19 JARDIM, A. C. G. et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants  
20 are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral**  
21 **Research**, v. 115, p. 39–47, 2015.
- 22 JIN, H. et al. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C  
23 virus replication in vitro. **Hepatology research : the official journal of the**  
24 **Japan Society of Hepatology**, v. 38, n. 9, p. 909–918, 2008.
- 25 JONES, D. M. et al. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-  
26 complement viral RNA replication and modulates production of infectious  
27 virus. **Journal of virology**, v. 83, p. 2163–2177, 2009.
- 28 KAITO, M. et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron

- 1 microscopic study. **The Journal of general virology**, v. 75 ( Pt 7), p. 1755–  
2 1760, 1994.
- 3 KHALIQ, S. et al. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV.  
4 **Biotechnology advances**, v. 28, n. 1, p. 27–34, 2010.
- 5 KINI, R. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake  
6 venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon: official journal of the**  
7 **International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003.
- 8 KLENERMAN, P.; FLEMING, V.; BARNES, E. What are the prospects for  
9 controlling hepatitis C? **PLoS medicine**, v. 6, n. 6, 2009.
- 10 KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics -  
11 Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497–506, 2012.
- 12 KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of  
13 flavonoids: an overview. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750,  
14 jan. 2013.
- 15 LAMEIRA, J. et al. Structure-activity relationship study of flavone  
16 compounds with anti-HIV-1 integrase activity: a density functional theory  
17 study. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 21, p. 7105–12, 1 nov.  
18 2006.
- 19 LEE, C. Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake  
20 venoms. **Annual review of pharmacology**, v. 12, p. 265–286, 1972.
- 21 LEMOS, M. A. et al. Acupuncture Needles Can Carry Hepatitis C Virus.  
22 **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 10, p. 1319–1321,  
23 16 out. 2014.
- 24 LEOPOLDINI, M. et al. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid  
25 quercetin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 17, p.  
26 6343–51, 23 ago. 2006.
- 27 LI, Q. et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant  
28 mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses.

- 1 **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1518–1525, 2011.
- 2 LIM, P. et al. Correlation Between NS5A Dimerization and HCV replication.  
3 **The Journal of biological chemistry**, p. 1–20, 2012.
- 4 LIN, C. et al. Bioactive flavonoids from *Ruellia tuberosa*. **J Chin Med**, v. 17,  
5 n. 3, p. 103–109, 2006.
- 6 LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry  
7 and assembly. **Nat Rev Micro**, v. 11, n. 10, p. 688–700, 2013.
- 8 LINDENBACH, B.; RICE, C. Unravelling hepatitis C virus replication from  
9 genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933–938, 2005.
- 10 LIU, G. et al. Protection against DNA damage and inhibition of lipid  
11 peroxidation by flavones from *Eremosparton songoricum* (Litv) Vass.  
12 **Research on Chemical Intermediates**, v. 32, n. 2, p. 145–152, 1 fev. 2006.
- 13 LYU, S.-Y.; RHIM, J.-Y.; PARK, W.-B. Antiherpetic activities of flavonoids  
14 against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro.  
15 **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 11, p. 1293–301, nov. 2005.
- 16 MACDONALD, A. et al. The hepatitis C virus NS5A protein binds to  
17 members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity.  
18 **J Gen Virol**, v. 85, p. 721–729, 2004.
- 19 MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus*  
20 *terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes.  
21 **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental**  
22 **Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 59–63, 2011.
- 23 MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of  
24 different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome  
25 distribution. **Journal of virology**, v. 66, p. 3225–3229, 1992.
- 26 MASUOKA, N.; ISOBE, T.; KUBO, I. Antioxidants from *Rabdosia japonica*.  
27 **Phytotherapy research : PTR**, v. 20, n. 3, p. 206–13, mar. 2006.
- 28 MATSUMOTO, Y. et al. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C

- 1 virus in vitro. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68992, jan. 2013.
- 2 MEENAKSHISUNDARAM, R.; SWENI, S.;  
3 THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN, P. Hypothesis of snake and  
4 insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review. **AIDS**  
5 **Research and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 25, 2009a.
- 6 MEENAKSHISUNDARAM, R.; SWENI, S.;  
7 THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN, P. Hypothesis of snake and  
8 insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review. **AIDS**  
9 **Research and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 25, jan. 2009b.
- 10 MIDDLETON, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell  
11 function. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 439, p.  
12 175–182, 1998.
- 13 MORENO-OTERO, R. Therapeutic modalities in hepatitis C: challenges and  
14 development. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 1, p. 10–19, 2005.
- 15 MUKHERJEE, S. et al. Identification and analysis of hepatitis C virus NS3  
16 helicase inhibitors using nucleic acid binding assays. **Nucleic acids**  
17 **research**, v. 40, n. 17, p. 8607–8621, 2012.
- 18 MULLER, V. D. et al. Phospholipase A2 Isolated from the Venom of *Crotalus*  
19 *durissus terrificus* Inactivates Dengue virus and Other Enveloped Viruses  
20 by Disrupting the Viral Envelope. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112351, jan.  
21 2014.
- 22 MULLER, V. D. M. et al. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus*  
23 *durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever  
24 viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507–515, 15 mar. 2012.
- 25 MURPHY, D. et al. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine  
26 genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated  
27 region sequences. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1102–  
28 1112, 2007.

- 1 MURPHY, D. G. et al. Biological and clinicopathological features associated  
2 with hepatitis C virus type 5 infections. **Journal of hepatology**, v. 24, p.  
3 109–113, 1996.
- 4 NAGGIE, S. Management of hepatitis C virus infection: the basics. **Topics**  
5 **in antiviral medicine**, v. 20, n. 5, p. 154–161, 2012.
- 6 NAHMIAS, Y. et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion  
7 is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. **Hepatology**, v. 47, n. 5,  
8 p. 1437–1445, maio 2008.
- 9 NGUYEN, V. et al. **The effects of NS5A inhibitors on NS5A**  
10 **phosphorylation, polyprotein processing and localization** **Journal of**  
11 **General Virology**, 2011.
- 12 NITODA, T.; ISOBE, T.; KUBO, I. Effects of phenolic compounds isolated  
13 from *Rabdosia japonica* on B16-F10 melanoma cells. **Phytotherapy**  
14 **research : PTR**, v. 22, n. 7, p. 867–72, jul. 2008.
- 15 OHTO, H. et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants.  
16 The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group.  
17 **The New England journal of medicine**, v. 330, n. 11, p. 744–50, 17 mar.  
18 1994.
- 19 PARIDA, M. M. et al. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss)  
20 leaves on dengue virus type-2 replication. **Journal of**  
21 **ethnopharmacology**, v. 79, p. 273–278, 2002.
- 22 PENIN, F. et al. Structure and function of the membrane anchor domain of  
23 hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem**, v. 279, p. 40835–  
24 40843, 2004.
- 25 PETRICEVICH, V. L.; MENDONÇA, R. Z. Inhibitory potential of *Crotalus*  
26 *durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p.  
27 143–153, ago. 2003.
- 28 PHAN, T. et al. The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to

- 1 RNA replication and virus particle assembly. **Journal of virology**, v. 85, n.  
2 3, p. 1193–1204, 2011.
- 3 POVEDA, E. et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting  
4 antiviral agents. **Antiviral research**, v. 108C, p. 181–191, 2014.
- 5 POYNARD, T. et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for  
6 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48  
7 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International  
8 Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v. 352, p. 1426–  
9 1432, 1998.
- 10 POYNARD, T. et al. Viral hepatitis C. **Lancet**, v. 362, n. 9401, p. 2095–  
11 2100, 2003.
- 12 QIU, D. et al. The effects of NS5A inhibitors on NS5A phosphorylation,  
13 polyprotein processing and localization. **The Journal of general virology**,  
14 v. 92, n. Pt 11, p. 2502–11, nov. 2011.
- 15 RADVANYI, F. et al. Interaction of crotoxin and its isolated subunits with  
16 spin-labeled fatty acids. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n.  
17 15, p. 8765–70, 25 jul. 1985.
- 18 RAIMONDI, S. et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for  
19 hepatocellular carcinoma development: A meta-analysis. **Journal of**  
20 **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1142–1154, jun. 2009.
- 21 ROMANO, K. et al. The molecular basis of drug resistance against hepatitis  
22 C virus NS3/4A protease inhibitors. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, 2012.
- 23 ROUILLE, Y. et al. Subcellular localization of hepatitis C virus structural  
24 proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. **J Virol**,  
25 v. 80, n. 6, p. 2832–2841, 2006.
- 26 SANT'ANA, C. D. et al. RETRACTED: Antiviral and antiparasite properties  
27 of an l-amino acid oxidase from the Snake Bothrops jararaca: Cloning and  
28 identification of a complete cDNA sequence. **Biochemical Pharmacology**,

- 1 v. 76, n. 2, p. 279–288, jul. 2008.
- 2 SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-  
3 inflammatory agents. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n.  
4 3, p. 273–278, 2010.
- 5 SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15  
6 years on. **The Journal of general virology**, v. 85, n. Pt 11, p. 3173–3188,  
7 2004.
- 8 SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of  
9 nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p.  
10 962–973, out. 2005.
- 11 SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus. **Current Topics in**  
12 **Microbiology and Immunology**, v. 369, p. 1–15, 2013.
- 13 SOUZA, J. et al. A Study on the Antipicornavirus Activity of Flavonoid  
14 Compounds (Flavones) by Using Quantum Chemical and Chemometric  
15 Methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 44, n. 3, p.  
16 1153–1161, 24 maio 2004.
- 17 SWADLING, L.; KLENERMAN, P.; BARNES, E. Ever closer to a  
18 prophylactic vaccine for HCV. **Expert opinion on biological therapy**, v.  
19 13, n. 8, p. 1109–1124, 2013.
- 20 TALWANI, R. et al. Current status of treatment for chronic hepatitis C virus  
21 infection. **Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)**, v. 48, n. 3, p. 219–  
22 31, mar. 2012.
- 23 THIMME, R.; BINDER, M.; BARTENSCHLAGER, R. Failure of innate and  
24 adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. **FEMS**  
25 **microbiology reviews**, v. 36, n. 3, p. 663–83, 2012.
- 26 THOMPSON, A. A. et al. Biochemical characterization of recombinant  
27 hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis  
28 and adenylate kinase activity. **Biochemistry**, v. 48, p. 906–916, 2009.

- 1 THOMPSON, A. J.; LOCARNINI, S. A.; BEARD, M. R. **Resistance to anti-**  
2 **HCV protease inhibitors***Current Opinion in Virology*, 2011.
- 3 VAN AGTMAEL, M. A.; EGGELTE, T. A.; VAN BOXTEL, C. J. **Artemisinin**  
4 **drugs in the treatment of malaria: From medicinal herb to registered**  
5 **medication***Trends in Pharmacological Sciences*, 1999.
- 6 VERDEGEM, D. et al. Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus  
7 has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. **The**  
8 **Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20441–20454, 2011.
- 9 WANDELER, G. et al. Hepatitis C: a changing epidemic. **Swiss Medical**  
10 **Weekly**, n. February, p. 1–9, 6 fev. 2015.
- 11 W.H.O. Hepatitis C Fact Sheet. World Health Organization, 2015:  
12 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- 13 WOHLFARTH, C.; EFFERTH, T. Natural products as promising drug  
14 candidates for the treatment of hepatitis B and C. **Acta pharmacologica**  
15 **Sinica**, v. 30, n. 1, p. 25–30, 2009.
- 16 WYLES, D. L. Antiviral Resistance and the Future Landscape of Hepatitis  
17 C Virus Infection Therapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. suppl  
18 1, p. S33–S39, 15 mar. 2013.
- 19 XING, X.-K. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by single and dual  
20 small interfering RNA using an HCV-infected cell model. **Biotechnology**  
21 **letters**, v. 34, n. 2, p. 295–301, 2012.
- 22 YAN, R. et al. A new natural  $\alpha$ -helical peptide from the venom of the  
23 scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 11–19,  
24 2011.
- 25 YI, W. et al. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer  
26 cell proliferation and induce apoptosis. **Journal of Agricultural and Food**  
27 **Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7320–7329, 2005.
- 28 ZAIDI, F. et al. Free flavonoid aglycones from leaves of *mentha pulegium*

- 1 and mentha suaveolens (labiatae). **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 991–  
2 994, jul. 1998.
- 3 ZEISEL, M. B.; FELMLEE, D. J.; BAUMERT, T. F. Hepatitis C virus entry.  
4 **Current topics in microbiology and immunology**, v. 369, p. 87–112,  
5 2013.
- 6 ZEUZEM, S. Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and  
7 future perspectives. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 610–  
8 622, 2008.
- 9 ZHOU, D. et al. Separation of near full-length hepatitis C virus quasispecies  
10 variants from a complex population. **Journal of virological methods**, v.  
11 141, n. 2, p. 220–224, 2007.
- 12 ZHU, W. et al. The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid,  
13 increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against  
14 reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP–  
15 PKA-dependent signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**,  
16 v. 52, n. 2, p. 314–327, 15 jan. 2012.