



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

Guilherme Rodrigues Fernandes Campos

Análise do efeito *in vitro* de acridonas na replicação do Vírus da  
Hepatite C

São José do Rio Preto  
2016

Guilherme Rodrigues Fernandes Campos

Análise do efeito *in vitro* de acridonas na replicação do Vírus da  
Hepatite C

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Micobiologia, 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>. Paula Rahal  
Co-orientador: Dr<sup>ª</sup> Cintia Bittar Oliva  
Co-orientador: Dr<sup>ª</sup> Ana Carolina Gomes Jardim

São José do Rio Preto  
2016

Campos, Guilherme Rodrigues Fernandes.

Análise do efeito in vitro de acridonas na replicação do Vírus da Hepatite C / Guilherme Rodrigues Fernandes Campos. – São José do Rio Preto, 2016

77 f. : il.

Orientador: Paula Rahal

Coorientador: Cintia Bittar Oliva

Coorientador: Ana Carolina Gomes Jardim

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

1. Virologia. 2. Hepacivirus. 3. Hepatite C. 4. Vírus - Aspectos Genéticos. 5. Agentes antivirais. 6. Acridonas. I. Rahal, Paula.  
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 de São José do Rio Preto

Guilherme Rodrigues Fernandes Campos

Análise do efeito *in vitro* de acridonas na replicação do Vírus da  
Hepatite C

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>. Paula Rahal  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Bernardes Terzian  
FAMERP – São José do Rio Preto

Dr<sup>a</sup>. Paola Jocelan Scarin Provazzi  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
19 de Fevereiro de 2016

## RESUMO

A Hepatite C, causada pelo vírus da Hepatite C (HCV), afeta cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo. O HCV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Hepacivirus*, possui genoma de RNA fita simples de polaridade positiva que codifica uma poliproteína posteriormente clivada por proteases virais e do hospedeiro, resultando em 10 proteínas virais. O tratamento atual, baseado na administração de Interferon e dos novos antivirais de ação direta, possui um alto custo e a resposta virológica sustentada varia de acordo com o genótipo viral. Acridonas, um grupo de compostos extraído de fontes naturais, mostrou potencial ação antiviral contra o HCV, entretanto sua possível atividade antiviral foi pouco explorada em cultura de células. Dessa forma, esse estudo visou avaliar a influência de 14 acridonas sintéticas no ciclo replicativo do HCV. Os compostos foram triados utilizando a linhagem celular Huh 7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1-FEO. Células foram incubadas na presença e ausência de compostos por 72 horas. Viabilidade celular e níveis de replicação foram obtidos por ensaios de MTT e expressão de luciferase, respectivamente. A acridona Fac4 apresentou uma inibição de replicação de aproximadamente 90 % a 50  $\mu$ M, com 100 % de viabilidade celular. O Fac4 foi selecionado para a realização dos experimentos seguintes. O efeito de Fac4 nas etapas de replicação e entrada viral foi avaliado em células Huh 7.5 infectadas com partículas virais de HCV JFH1 produzidas em laboratório (HCVcc). Fac4 inibiu a replicação do JFH1 em aproximadamente 70 %, enquanto que na etapa de entrada nenhum efeito foi observado. A expressão da proteína viral NS5A foi avaliada pelo ensaio de *Western Blotting* e não foi detectada na amostra tratada com Fac4, corroborando os resultados anteriores. Apesar desses resultados, nenhum efeito inibitório foi observado na replicação do genótipo 3. Algumas acridonas são conhecidas por intercalar em moléculas de RNA dupla fita, que são intermediários de replicação, interrompendo assim a replicação viral. Um ensaio de intercalação em RNA

dupla fita foi realizado para testar se esse seria o mecanismo de ação desse composto. Fac4 não apresentou atividade de intercalação. Outros ensaios são necessários para avaliar como Fac4 interfere na replicação do HCV.

Palavras-chave: HCV. Tratamento. Acridona.

## **ABSTRACT**

*Hepatitis C, caused by Hepatitis C Virus (HCV), affects about 170 million people worldwide. HCV belongs to Flaviviridae family and Hepacivirus genus, has a positive single stranded RNA genome that codifies a polyprotein, which is cleaved by host and viral proteases, resulting in 10 viral proteins. The current treatment, based on Interferon and the new Direct Acting Antivirals, has a high cost and variable response rates according to the virus genotype. Acridones, a group of compounds extracted from natural sources, showed potential antiviral actions against HCV, however their possible antiviral activity have been poorly explored in cell culture. Thus, this study aimed to evaluate the influence of a panel of 14 synthetic acridones on HCV life cycle. The compounds were screened using Huh 7.5 cell line expressing the HCV subgenomic replicon SGR-JFH1-FEO. Cells were incubated in the presence and absence of compounds for 72 hours. Cell viability and replication levels were accessed by MTT and luciferase assays, respectively. The Acridone Fac4 presented a replication inhibition of approximately 90 % at 50  $\mu$ M and 100 % of cell viability and was selected for the follow-up experiments. The effect of Fac4 was evaluated in the replication and entry steps using Huh 7.5 cells infected with viral particles from JFH-1 strain produced in laboratory (HCVcc). Fac4 inhibited the replication of JFH-1 by approximately 70 %, while no effect was observed on virus entry. The expression of the viral protein NS5A was evaluated by Western Blotting assay and was undetectable in Fac4 treated sample, corroborating previous results. Despite these results, no inhibitory effect was observed against genotype 3 replication. Some acridones are known to intercalate in dsRNA molecules, which are replication intermediates, disrupting replication. We performed a dsRNA intercalation assay in order to test if this is the mode of action of this compound. Fac4 showed no intercalation activity. Further experiments are necessary to evaluate how Fac4 interferes in HCV replication.*

**Keywords:** HCV. Treatment. Acridones.

*Dedico essa conquista à minha família. Meus pais, José e Neire, que desde pequeno me incentivam e me motivam a ser uma pessoa íntegra e honesta. Meu irmão Ricardo, que incondicionalmente sempre esteve e estará ao meu lado. E minha namorada e amiga Juliana, por ser meu propósito e me fazer alguém melhor todos os dias. Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Prof<sup>a</sup>. Paula Rahal, Dr<sup>a</sup>. Cintia Bittar e Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Gomes Jardim, agradeço imensamente pela enorme paciência e pela dedicação em me passar um pouco de seu conhecimento; Pela oportunidade a mim cedida e pela dedicação em me ajudar a alcançar essa conquista tão importante em minha vida.

A todos os companheiros do Laboratório de Estudos Genômicos: Ana Beatriz, Ana Cláudia, André, Bruna, Bruno, Carina, Carol Bonfim, Carol Jardim, Cintia, Francielly, Jacqueline, Lenira, Letícia, Maria Letícia, Mariana, Marília, Marina, Mônica, Natália, Paola, Rafael, Renata, Rodolfo, Stephane, agradeço a companhia e o aprendizado.

Aos meus pais, agradeço pelo estímulo, carinho, compreensão e amor a mim dedicados, durante essa e todas as outras etapas da minha vida, me ensinando que não basta querer que algo caia do céu, é preciso trabalho e esforço para fazer acontecer.

Ao meu irmão Ricardo, que desde pequeno está comigo em tudo o que faço e me faz ver nele a minha própria imagem, assim como todo o caminho que percorri até este momento. Agradeço pelo companheirismo e por me fazer crescer.

À minha namorada Juliana, agradeço pelo carinho, amor e paciência. Por ser minha amiga, companheira e propósito, se dedicando a mim e me incentivando sempre, até o fim. Sem seu apoio, poderia até ter chegado aqui, mas jamais seria tão doce como foi, e sempre será, ao seu lado.

À CAPES, agradeço pelo financiamento desse projeto, sem o qual o mesmo não poderia ser realizado.

Aos meus familiares mais distantes, agradeço pelo carinho, compreensão e pelos momentos maravilhosos, mas infelizmente raros, em família.

Aos meus amigos de longa data, Bruno, Brenno, Juninho, Leo, Vinícius, Luga, Gui, agradeço pelos momentos inesquecíveis de escola e faculdade, pelo futebol, pela

música, pelas risadas e por ainda sim continuarem meus amigos, mesmo quando nossos caminhos se tornam diferentes.

À família futsal do IBILCE, agradeço imensamente pelo convívio, pelas conquistas e alegrias que me proporcionaram durante os últimos cinco anos.

## Sumário

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I .....                                                                         | 13 |
| INTRODUÇÃO .....                                                                         | 14 |
| A Hepatite C .....                                                                       | 14 |
| O Vírus da Hepatite C.....                                                               | 14 |
| Cultura de HCV <i>in vitro</i> .....                                                     | 17 |
| Tratamento .....                                                                         | 18 |
| Compostos naturais na terapia antiviral .....                                            | 20 |
| Acridonas .....                                                                          | 21 |
| JUSTIFICATIVA.....                                                                       | 22 |
| OBJETIVOS .....                                                                          | 23 |
| Objetivos Gerais .....                                                                   | 23 |
| Objetivos específicos .....                                                              | 23 |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                 | 24 |
| Síntese de compostos .....                                                               | 24 |
| Construções .....                                                                        | 24 |
| Cultura de células .....                                                                 | 24 |
| Delineamento experimental .....                                                          | 25 |
| Ensaio de replicação .....                                                               | 25 |
| Ensaio de citotoxicidade .....                                                           | 25 |
| EC <sub>50</sub> e CC <sub>50</sub> .....                                                | 26 |
| Produção viral .....                                                                     | 26 |
| Ensaio de replicação para o JFH1.....                                                    | 27 |
| Entrada Viral .....                                                                      | 27 |
| <i>Western Blotting</i> .....                                                            | 27 |
| Ensaio de Intercalação em dsRNA .....                                                    | 28 |
| Forma de análise dos resultados .....                                                    | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                         | 30 |
| CAPÍTULO II .....                                                                        | 47 |
| Hepatitis C Virus <i>in vitro</i> replication is efficiently inhibited by Acridone ..... | 48 |
| Abstract .....                                                                           | 48 |

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction .....</b>                            | <b>49</b> |
| <b>Materials and Methods.....</b>                    | <b>51</b> |
| Compounds synthesis .....                            | 51        |
| Constructs.....                                      | 51        |
| Cell culture.....                                    | 51        |
| Experimental delineation for initial screening ..... | 52        |
| Replication assay for subgenomic replicons .....     | 52        |
| Cytotoxicity assay.....                              | 52        |
| Effective Concentration 50% (EC50) .....             | 52        |
| Viral production .....                               | 53        |
| Replication assay for JFH1.....                      | 53        |
| Viral entry .....                                    | 53        |
| Western blotting .....                               | 53        |
| dsRNA intercalation assay .....                      | 54        |
| Data analysis.....                                   | 54        |
| <b>Results .....</b>                                 | <b>55</b> |
| Fac4 activity against JFH1 replication .....         | 55        |
| Fac4 as a dsRNA intercalator .....                   | 55        |
| Fac4 does not act in viral entry .....               | 56        |
| <b>Discussion .....</b>                              | <b>57</b> |
| <b>Conclusion.....</b>                               | <b>58</b> |
| <b>Figures .....</b>                                 | <b>59</b> |
| <b>References .....</b>                              | <b>62</b> |

# **CAPÍTULO I**

## INTRODUÇÃO

### A Hepatite C

A Hepatite C é a inflamação do fígado causada pela infecção pelo Vírus da hepatite C (HCV – do inglês *Hepatitis C Virus*). Este vírus é transmitido principalmente pelo contato direto com sangue contaminado, mais precisamente no compartilhamento de seringas, na utilização de materiais médico-hospitalares não esterilizados (materiais cirúrgicos, perfuro-cortantes) e transfusões sanguíneas sem a devida triagem (Akahane, Kojima *et al.*, 1994). Hoje, a Hepatite C é um problema amplamente distribuído no mundo, acometendo aproximadamente 170 milhões de pessoas, onde, somente no Brasil, esse número se aproxima de 3 a 4 milhões de infectados (Alter e Seeff, 2000; Araujo E.S.A., 2003; Houghton, 2009).

### O Vírus da Hepatite C

Membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Hepacivirus*, o HCV possui genoma de RNA fita simples positiva, encapsulado e codifica uma RNA polimerase dependente de RNA viral sendo, portanto caracterizado como vírus de classe IV, de acordo com a classificação de Baltimore (Baltimore, 1971; Penin, Dubuisson *et al.*, 2004). Com tamanho de 9,6 kb, sua matriz de leitura aberta é flanqueada por regiões 3' e 5' não traduzidas (UTRs) altamente conservadas, que ao ser traduzida, gera uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos (Suzuki, Ishii *et al.*, 2007). Proteases, tanto virais como do hospedeiro, atuam clivando essa poliproteína recém sintetizada, originando as 10 proteínas virais, divididas em 3 estruturais, que são responsáveis pela formação do capsídeo (Core) e do envelope (E1 e E2) e 7 não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), envolvidas nas diversas etapas da replicação viral (Penin, Dubuisson *et al.*, 2004; Lindenbach e Rice, 2005; Dustin e Rice, 2007).

A proteína Core possui principal papel na formação do núcleocapsídeo viral. Acredita-se que esta proteína tenha envolvimento na esteatose e no hepatocarcinoma (Lemon, Walker *et al.*, 2007; Li, Ma *et al.*, 2014). As glicoproteínas E1 e E2 compõem o envelope viral e apresentam papel importante no reconhecimento e na entrada do vírus na célula possuindo regiões altamente variáveis (Lemon, Walker *et al.*, 2007).

Com relação às proteínas não estruturais, a proteína p7 é conhecida por formar canais iônicos em membranas celulares (Griffin, Beales *et al.*, 2003; Chandler, Penin *et*

*et al.*, 2012), se mostrando essencial para a eficiente infecção por HCV *in vivo*, montagem e liberação de partículas virais (Sakai, Claire *et al.*, 2003; Jones, Murray *et al.*, 2007; Steinmann, Penin *et al.*, 2007; Wozniak, Griffin *et al.*, 2010). NS2 é uma proteína transmembranica inserida no retículo endoplasmático que possui atividade essencial na montagem dos virions, além de atuar juntamente com a proteína NS3 com atividade de protease (Schregel, Jacobi *et al.*, 2009; Boson, Granio *et al.*, 2011; Ma, Anantpadma *et al.*, 2011; Popescu, Callens *et al.*, 2011). Recentemente, a capacidade de bloqueio da via de dano de DNA pela NS2 foi descrita, onde a proteína viral atua na retenção de p53 no citoplasma, impedindo sua ação como ativador transcricional (Bittar, Shrivastava *et al.*, 2013). A NS3 possui função de ATPase e helicase, o que a torna essencial durante a replicação viral (Piccininni, Varaklioti *et al.*, 2002). Um de seus domínios, juntamente com a NS4A, atua como protease no processo de clivagem da poliproteína do vírus (Yao, Reichert *et al.*, 1999; Morikawa, Lange *et al.*, 2011). NS4B induz a formação da “rede membranosas”, um aglomerado de vesículas membranosas que suportam o complexo replicativo, estrutura essa composta por proteínas virais e fatores celulares (Egger, Wolk *et al.*, 2002; Gosert, Egger *et al.*, 2003). A NS4B também atua na montagem de partículas virais (Gosert, Egger *et al.*, 2003). A proteína viral NS5A apresenta diversas funções, com destaque para o direto envolvimento na replicação do RNA, assim como na montagem de partículas virais (Appel, Zayas *et al.*, 2008; Tellinghuisen, Foss *et al.*, 2008; Kim, Welsch *et al.*, 2011). Variantes virais que apresentaram mutações em uma região específica da proteína NS5A, denominada ISDR (do inglês *Interferon sensitivity determining region*), se mostraram sensíveis ao tratamento com interferon, sugerindo um papel dessa proteína na aquisição de resistência ao tratamento com esse medicamento (Enomoto, Sakuma *et al.*, 1995; Enomoto, Sakuma *et al.*, 1996). Por fim, a NS5B, conhecida por sua ação como RNA polimerase dependente de RNA, é a responsável por sintetizar as novas fitas durante a replicação do genoma do HCV (Behrens, Tomei *et al.*, 1996; Lohmann, Korner *et al.*, 1997; Simister, Schmitt *et al.*, 2009).

O vírus da hepatite C possui um tropismo pelos hepatócitos humanos (Wieland, Makowska *et al.*, 2014), embora atualmente se conheça outros tipos celulares permissivos à infecção pelo HCV, como o caso dos colangiócitos, células epiteliais responsáveis por revestir os ductos biliares (Ralphs e Khan, 2013; Fletcher, Humphreys *et al.*, 2015). Neste caso em específico, colangiócitos primários se mostraram resistentes à entrada e replicação viral, porém linhagens de colangiocarcinoma se mostraram

permissivas ao HCV, com taxas de entrada e replicação similares a de hepatócitos, sugerindo, juntamente com outros trabalhos, uma relação entre HCV e tumores de vias biliares (Yin e Chen, 1998; Lu, Ye *et al.*, 2000; Perumal, Wang *et al.*, 2006; Fletcher, Humphreys *et al.*, 2015).

Uma vez dentro da célula, o HCV utiliza a maquinaria hospedeira para realizar seu ciclo replicativo. Logo após a entrada da partícula viral, ocorre a liberação do genoma viral no citoplasma, que devido à sua polaridade positiva ( $5' \rightarrow 3'$ ) é prontamente traduzido pelos ribossomos (Tang e Grise, 2009; Niepmann, 2013; Li, Yamane *et al.*, 2015). Esse processo é controlado pela IRES (*internal ribosome entry site*), situada próximo a extremidade 5', e necessita ocorrer antes da síntese de RNA, uma vez que essa somente acontece após a formação do complexo replicativo associado à “rede membranosa” (Wang, Sarnow *et al.*, 1993; Ahlquist, Noueiry *et al.*, 2003; Gosert, Egger *et al.*, 2003; Niepmann, 2013; Chatel-Chaix e Bartenschlager, 2014; Li, Yamane *et al.*, 2015). Após a tradução, o RNA viral pode ser usado como molde para a síntese de fitas de RNA polaridade negativa ( $3' \rightarrow 5'$ ) que serão utilizadas como modelo para a síntese de novas moléculas de RNA senso positivo, sendo essas destinadas ou para a síntese proteica no retículo endoplasmático ou para empacotamento durante a montagem de novas partículas virais (Bartenschlager, Frese *et al.*, 2004; Pawlotsky, Chevaliez *et al.*, 2007; Li, Yamane *et al.*, 2015). Essa montagem ocorre em “corpúsculos lipídicos” (do inglês *Lipid Droplets*) no citoplasma (Miyazawa, Atsuzawa *et al.*, 2007), originando novos vírions que serão liberados para iniciar o ciclo replicativo em outras células (Kanda, Basu *et al.*, 2006).

Devido principalmente a ausência de atividade corretiva da RNA polimerase viral NS5B, e a elevada taxa de replicação viral durante a infecção (Argentini, Genovese *et al.*, 2009), o vírus apresenta uma alta heterogeneidade genética, levando à classificação do HCV em genótipos distintos quando a diferença entre genomas é de 30% (numerados de 1 a 7) e subtipos, quando a divergência é de 20% (classificados por letras minúsculas – a, b, c) (Simmonds, Holmes *et al.*, 1993; Simmonds, Bukh *et al.*, 2005; Murphy, Chamberland *et al.*, 2007). Além dessas classificações, variações menores também devem ser levadas em conta. Um indivíduo infectado por HCV apresenta as chamadas *quasispecies*, um “pool” de variantes virais geneticamente relacionadas com menos de 5% de diferença entre si (Davis, 1999). As *quasispecies* desempenham papel fundamental na aquisição de resistência aos tratamentos contra o HCV. Em tratamentos baseados em interferon- $\alpha$  este reduz a heterogeneidade viral,

porém após o tratamento o “pool” de variantes se modifica, podendo estabelecer nova população de *quasispecies* resistentes. A pressão seletiva exercida pelo medicamento permite a emergência de variantes resistentes, tornando o paciente menos sensível ao tratamento com interferon- $\alpha$  (Gonzalez-Peralta, Qian *et al.*, 1996; Toyoda, Kumada *et al.*, 1997; Mizokami, Ohno *et al.*, 1999). Essa alta variabilidade também influencia a eficácia do tratamento com drogas de ação direta, favorecendo o surgimento de mutações de resistência (Le Guillou-Guillemette, Vallet *et al.*, 2007).

Dentre os genótipos virais, o genótipo 1 apresenta a maior distribuição, relacionado com cerca de 46% dos casos relatados no mundo, seguido pelo genótipo 3 com 22% dos casos, genótipo 2 com 13% e genótipo 4, também com 13%. Os genótipos 5 e 6 são os de menor distribuição, correspondendo à 1% e 2% dos casos, respectivamente. Quando se avalia mais intrinsecamente determinadas regiões, pode-se observar que outros genótipos são mais prevalentes que o genótipo 1, como é o caso da África e do Oriente Médio, onde o genótipo 4 é responsável por 71% das infecções (Gower, Estes *et al.*, 2014).

### **Cultura de HCV *in vitro***

Um dos principais problemas no estudo do HCV é a dificuldade de se estabelecer um modelo animal de pequeno porte e de fácil manuseio. Devido a essa problemática no trabalho *in vivo*, sistemas *in vitro* se tornam essenciais no estudo do vírus. A partir de amostras de um paciente japonês com hepatite fulminante, foi isolado um clone do HCV, genótipo 2a, denominado JFH-1 (Kato, Furusaka *et al.*, 2001). Desse isolamento, foi desenvolvido em 2005 um replicon subgenômico que permitiu avaliar a replicação viral *in vitro*. Contendo somente a região do genoma viral que codifica as proteínas não estruturais, esse replicon é capaz de se replicar eficientemente em linhagens Huh 7 e Huh 7.5 (linhagens de hepatocarcinoma humano) (Date, Kato *et al.*, 2004; Heller, Saito *et al.*, 2005; Kato, Date *et al.*, 2005; Wakita, Pietschmann *et al.*, 2005; Zhong, Gastaminza *et al.*, 2005; Miyamoto, Kato *et al.*, 2006).

Além desse sistema de replicon subgenômico, a partir do clone JFH-1 foi possível a produção de partículas virais infecciosas em laboratório, o que permitiu estudar, *in vitro*, as outras etapas do ciclo replicativo além da replicação, como a entrada e a liberação viral (Wakita, Pietschmann *et al.*, 2005). Todos esses procedimentos facilitaram e tornaram mais rápido a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos contra o HCV.

## Tratamento

A infecção, em seu estágio inicial, é denominada de fase aguda, e em 70% a 80% dos casos ocorre a progressão para a fase crônica (Seeff, 2009). O primeiro tratamento utilizado para Hepatite C foi o interferon (IFN), uma citocina componente da resposta imune inata, que atua induzindo a expressão de vias antivirais, mais precisamente dos genes ISGs (do inglês *IFN-Stimulated Genes*), que codificam proteínas atuantes na modulação da resposta imune e na atividade antiviral (De Veer, Holko *et al.*, 2001). Células não infectadas expressam o interferon normalmente, porém uma vez na célula, o HCV interfere na expressão desta citocina, e consequentemente, dos genes ISGs, facilitando o estabelecimento da infecção (Raychoudhuri, Shrivastava *et al.*, 2010; Chowdhury, Kim *et al.*, 2014). Este tratamento apresenta diversos efeitos colaterais, como anemia, distúrbios autoimunes, diarreia, eritema, retinopatia e perda de peso (Brasil, 2011).

A utilização do interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) como tratamento para a Hepatite C iniciou por volta de 1986, antes mesmo da descoberta do agente etiológico da doença. Foi utilizado primeiramente como uma monoterapia, o que resultava em uma resposta virológica sustentada (RVS) de 20% a 30% (Hoofnagle, Mullen *et al.*, 1986; Romeo, Rumi *et al.*, 1995; Shiratori, Kato *et al.*, 1997). Com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento, o INF- $\alpha$  foi combinado à Ribavirina, proporcionando valores de RVS de 60%, para os genótipos 2 e 3 e 40% para genótipo 1 (Davis, Esteban-Mur *et al.*, 1998; Mchutchison, Gordon *et al.*, 1998; Poynard, Marcellin *et al.*, 1998; Kato, 2001). A modificação do interferon com polietilenoglicol (pegINF) associado à ribavirina aumentou a RVS em até 40% (Manns, Mchutchison *et al.*, 2001; Fried, Shiffman *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento de novas drogas com ação antiviral direta (DAA – *Direct acting antiviral*), como por exemplo, os inibidores de protease Boceprevir e Telaprevir, foi desenvolvida a chamada terapia tripla, que consiste na associação de um desses inibidores com os dois componentes do tratamento usual (pegINF- $\alpha$  e Ribavirina) (Ghany, Nelson *et al.*, 2011). Na terapia tripla, tanto o Boceprevir quanto o Telaprevir atuam sobre a protease viral NS3/4A, que possui papel crucial para o completo ciclo viral. Outro DAA inibidor de protease, o Simeprevir, já foi aprovado em alguns países, como Japão e Estados Unidos, com ação contra os genótipos 1, 2, 4, 5 e 6

(Rosenquist, Samuelsson *et al.*, 2014). Drogas de ação direta que atuam em outras proteínas virais como NS5A e NS5B são efetivas em todos os genótipos (Poveda, Wyles *et al.*, 2014). Dentre os que estão sendo utilizados destacam-se o inibidor de polimerase Sofosbuvir (Lawitz, Lalezari *et al.*, 2013) e o inibidor de NS5A, Daclatasvir (Gao, Nettles *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo protocolo publicado em julho de 2015 pelo ministério da saúde, a administração de alfa peguinterferon ( $\alpha$ -pegINF) e ribavirina ocorre somente em alguns casos, e o uso dos inibidores de protease de primeira geração (Boceprevir e Telaprevir) foi descontinuado. Em seu lugar, adicionaram-se outras drogas de ação direta contra o vírus, como o Sofosbuvir, o Simeprevir e o Daclatasvir. Essa mudança apresenta vantagens para os pacientes e profissionais da saúde, como menor duração do tratamento, menos efeitos colaterais, maior facilidade na posologia e principalmente melhora nos resultados quando comparado ao tratamento anterior (Kohli, Shaffer *et al.*, 2014; Brasil, 2015). O tratamento hoje consiste em geral de terapia combinada, levando em consideração o genótipo viral, estado clínico do paciente e grau de comprometimento do fígado para a definição do tempo de tratamento e de quais drogas serão utilizadas.

Apesar dos melhores resultados obtidos com a administração do novo tratamento, já existem relatos de variantes virais resistentes aos novos medicamentos. Trabalhos *in vitro* e *in vivo* descreveram mutações relacionadas à resistência ao inibidor de NS5B Sofosbuvir (Lam, Espiritu *et al.*, 2012; Gane, Stedman *et al.*, 2013; Gerber, Welzel *et al.*, 2013; Lawitz, Poordad *et al.*, 2014) enquanto outros relatam a resistência viral ao tratamento com o inibidor de NS5A Daclatasvir (Plaza, Soriano *et al.*, 2012; Mcphee, Hernandez *et al.*, 2014). A alta diversidade genética encontrada no hospedeiro, proveniente de alta taxa mutacional do vírus e da característica de circular como *quasispecies*, leva a uma diversidade populacional do vírus no hospedeiro elevada, que aliada a diferentes pressões seletivas impostas permite uma rápida adaptação (Cruz-Rivera, Carpio-Pedroza *et al.*, 2013; Honegger, Kim *et al.*, 2013). Esse preceito ajuda a entender como ocorre o surgimento de variantes resistentes a novos antivirais, onde o processo de evolução molecular possui papel fundamental (Ralston, Jacobson *et al.*, 2011; Preciado, Valva *et al.*, 2014). Buscar novos fármacos com mecanismos de ação eficazes, de maior espectro de ação, menos efeitos colaterais e que evadam a persistência viral se mostra necessário.

## Compostos naturais na terapia antiviral

Há muitos anos, plantas são utilizadas para o tratamento de doenças humanas, e diversas drogas utilizadas hoje são derivadas de fontes naturais, caso da aspirina, por exemplo, baseada em um produto natural extraído da planta *Salix alba*, popularmente conhecida como salgueiro-branco, e da morfina, proveniente da papoula *Papaver somniferum* (Newman, Cragg *et al.*, 2000).

Os compostos naturais podem ser obtidos a partir das mais variadas fontes. Em geral, as plantas compreendem um grande foco de estudos para a extração e isolamento de compostos com atividade farmacológica (Crozier, Clifford *et al.*, 2006; Osbourn e Lanzotti, 2009). Porém, existem outras fontes importantes para a obtenção e validação de novos medicamentos, como é o caso de alguns fungos (Matsunaga, Kamisuki *et al.*, 2015) e até mesmo de venenos de animais como escorpiões e cobras (Muller, Soares *et al.*, 2014; El-Bitar, Sarhan *et al.*, 2015; Ramirez-Carreto, Jimenez-Vargas *et al.*, 2015).

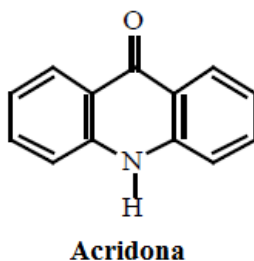
Com relação às infecções virais, compostos extraídos de ervas medicinais chinesas e da planta *Prunella vulgaris* apresentaram potencial atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Chang e Yeung, 1988; Tabbá, Chang *et al.*, 1989; Yao, Wainberg *et al.*, 1992), enquanto outros, como a matrinalina e a oxymatrina, alcalóides extraídos das plantas *Sophora flavescens* e *Sophora subprostrata*, foram eficazes no controle da infecção por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C (Lu, Zeng *et al.*, 2003; Lu, Zeng *et al.*, 2004; Mao, Zeng *et al.*, 2004).

A produção de drogas sintéticas com estrutura baseada em compostos naturais se tornou frequente nos últimos anos (Newman e Cragg, 2007; Butler, 2008; Harvey, 2008). Esses compostos produzidos em laboratório facilitaram muito a triagem de novos medicamentos por empresas farmacêuticas. Os produtos naturais são, em geral, absorvidos mais rapidamente por possuírem uma massa molar menor quando comparados aos seus derivados sintéticos (Ganesan, 2008; Harvey, 2008). Entretanto, a predileção pelos sintéticos ocorre principalmente devido à dificuldade de acesso aos compostos naturais, complexidade de produção em larga escala e preocupação com os direitos à propriedade intelectual, uma vez que esses produtos de fontes naturais não são patenteáveis. Além disso, a síntese em laboratório permite a criação de bibliotecas de compostos a partir de métodos de combinação química, favorecendo a descoberta de novas drogas em menor tempo (Singh e Barrett, 2006; Baker, Chu *et al.*, 2007; Mcchesney, Venkataraman *et al.*, 2007; Rishton, 2008).

## Acridonas

Acridonas são compostos orgânicos derivados de acridinas, contendo um grupo carbonil na posição 9 (Figura 1) (Demeunynck, Charmantray *et al.*, 2001). Esses compostos compartilham entre si uma capacidade de intercalação no DNA, principalmente em decorrência da presença de um cromóforo que permite sua ligação entre os pares de bases, e por isso apresentam diversas propriedades químicas e biológicas (Denny, 1990). A ação antiviral de derivados de acridonas já é conhecida na literatura, com atividade inibitória na replicação dos vírus herpes simplex tipo 2 e citomegalovírus (HSV-2 e CMV, respectivamente), além de atuar também inibindo a transcrição do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Yamamoto, Furukawa *et al.*, 1989; Turpin, Buckheit *et al.*, 1998; Fujiwara, Okamoto *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram o potencial anti-HCV de derivados de acridona, principalmente na inibição da transcrição, atuando como intercalantes de moléculas de RNA, e agindo diretamente na helicase viral NS3 (Stankiewicz-Drogon, Palchykovska *et al.*, 2008; Manfroni, Paeshuyse *et al.*, 2009; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010).

**Figura 1:** Estrutura básica das acridonas.



## JUSTIFICATIVA

Apesar do grande potencial farmacêutico existente em compostos extraídos de plantas, em muitos casos o isolamento e purificação se apresentam como processos limitantes, sendo necessária grande quantidade de material para o isolamento de compostos específicos. Ainda, compostos naturais não são patenteáveis, o que dificulta sua aplicação na comercialização como fármaco em grande escala. A produção de compostos sintéticos baseada na estrutura de compostos naturais permite a produção de grandes quantidades de compostos de forma sustentável. Outra vantagem é a possibilidade de modificações químicas que possam melhorar, por exemplo, sua atividade antiviral ou reduzir sua toxicidade.

Com relação às acridonas, o potencial antiviral de alguns derivados desse grupo já é descrito, contra diversos vírus, mas o promissor efeito direto anti-HCV utilizando proteínas virais como alvo foi observado somente em ensaios enzimáticos, observando seu efeito na proteína de forma isolada (Manfroni, Paeshuyse *et al.*, 2009; Stankiewicz-Dragon, Dorner *et al.*, 2010), e não em um contexto onde há interações entre diferentes proteínas celulares e virais.

Considerando esse amplo potencial farmacológico, avaliamos o efeito antiviral em cultura de células de acridonas sintéticas contra o vírus da Hepatite C.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais**

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de acridonas sintéticas no ciclo replicativo do HCV *in vitro*.

### **Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito inibitório desses compostos na replicação do vírus da hepatite C, em linhagem Huh 7.5 expressando de maneira estável o replicon subgenômico de HCV;
- Determinar os valores ótimos de concentração para o tratamento celular e o potencial antiviral de cada composto;
- Observar o efeito antiviral em sistema de infecção utilizando replicon viral completo JFH1, avaliando tanto a etapa de replicação como a etapa de entrada viral.
- Comparar os níveis de expressão de proteínas virais de células tratadas com as acridonas sintéticas e controles não tratados;
- Avaliar possíveis mecanismos de ação pelo qual as acridonas atuam na inibição do ciclo replicativo do vírus da hepatite C.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Síntese de compostos

Todos os compostos utilizados nesse trabalho foram sintetizados no Laboratório de Química Verde e Medicinal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, sob supervisão do Prof. Luis Octavio Regasini.

A preparação das acridonas consistiu de uma reação de condensação entre o ácido antranílico e derivados de floroglucinóis, na presença de ácido p-toluenossulfônico e 1-hexanol como solvente e catalizador, respectivamente. Um painel de 13 acridonas (Fac1-Fac6 e Fac14-Fac21) e uma benzoacridona (Fac22) foram obtidas.

### Construções

Para a triagem inicial dos compostos na etapa de replicação, o replicon subgenômico do HCV SGR-Feo-JFH1 foi utilizado (Wyles, Kaihara *et al.*, 2009). Essa construção carrega, além dos genes que codificam as proteínas virais não estruturais do HCV genótipo 2, o gene da proteína fosfotransferase de fusão luciferase-neomicina. Para avaliar se o efeito inibitório da replicação pelas acridonas ocorre no genótipo 3, foi utilizado o replicon subgenômico S52/SG-Feo (Saeed, Scheel *et al.*, 2012). Para analisar a replicação, a entrada viral e a expressão proteica por Western Blotting, ensaios de infecção foram realizados utilizando o replicon completo do HCV, o JFH1 (Wakita, Pietschmann *et al.*, 2005).

### Cultura de células

Linhagens celulares de hepatoma humano Huh 7.5 e Huh 7.5 expressando estavelmente os replicons subgenômicos SGR-JFH1-FEO e S52/SG-Feo foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium*; Sigma-Aldrich) com adição de 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Cultilab), 1 % de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) (100 unidades/ml e 100 µg/ml, respectivamente) e incubadas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Delineamento experimental**

Para a realização dos experimentos deste projeto foram montadas 2 placas de 96 poços, sendo 1 placa para o ensaio de citotoxicidade (72h) e 1 placa para o ensaio de replicação (72h). Foram plaqueadas  $3 \times 10^3$  células por poço, que foram analisadas 72h após o tratamento. Os ensaios foram realizados em triplicata e todas as placas tiveram como controles de tratamento Ciclosporina A à 1  $\mu$ M (controle positivo de inibição da replicação) e DMSO 0,1%. Inicialmente foram testadas quatro concentrações dos compostos, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ M e 0,4  $\mu$ M. Foram realizados 3 eventos para cada ensaio.

### **Ensaio de replicação**

Para os ensaios de replicação as células foram lisadas 72 horas após o tratamento. Esse procedimento foi realizado utilizando o *Passive Lysis Buffer* (Promega) e a taxa de replicação foi então quantificada pela medição da atividade da luciferase, utilizando o *Luciferase Assay System* (Promega). O processo se baseia na utilização de um substrato que ao ser degradado pela proteína luciferase emite uma luminosidade que pode ser captada e então sua expressão ser quantificada em leitor de placa (FLUOstar Omega – BMG Labtech). Dados foram normalizados pelo controle de DMSO.

### **Ensaio de citotoxicidade**

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Após a incubação das células tratadas (72h), DMEM contendo MTT (Sigma-Aldich) na concentração de 1 mg/ml foi adicionado a cada poço, incubado por 1 hora e substituído por 100  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Synth), que é o responsável por solubilizar os cristais de formazan no interior das células tratadas com o reagente MTT. A viabilidade celular foi então medida de acordo com a equação  $(T/C) \times 100\%$ , onde T representa a densidade óptica média das células tratadas, enquanto que C corresponde à densidade óptica média do grupo controle. Foram considerados não tóxicos compostos que apresentaram de 90% a 100% de viabilidade celular.

## EC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>

O EC<sub>50</sub> é o valor que representa a concentração de um composto onde 50% de seu efeito máximo é observado, enquanto que o CC<sub>50</sub> é o valor que representa a concentração onde 50% de citotoxicidade é observada. Ambos foram demonstrados para medir a efetividade dos compostos na inibição da replicação do vírus da hepatite C. A partir da concentração máxima de composto capaz de ser dissolvido em meio, uma diluição seriada em escala de log<sub>2</sub> foi realizada. Uma vez tratadas, as células foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade (MTT) e de replicação (luciferase) para obtenção do CC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub>, respectivamente, onde ambos os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 5. Uma vez obtidos, esses valores foram utilizados para calcular o índice de seletividade ( $SI = CC_{50}/EC_{50}$ ), que sugere o potencial antiviral do composto.

## Produção viral

O RNA do replicon completo JFH1 foi eletroporado em células Huh 7.5 seguindo os parâmetros de 270 V, 950 µF e resistência ∞, utilizando uma cubeta de 4 mm (*Gene Pulser Xcell Electroporation System* – Bio-Rad). Após 15 dias da eletroporação, o sobrenadante das células foi coletado e concentrado com PEG 8000 (Polietilenoglicol) (Sigma-Aldrich). Para titular o sobrenadante, este foi diluído de maneira seriada em base 10 ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , respectivamente) e cada concentração foi utilizada para infectar células Huh 7.5. Após 72h da infecção, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Synth), lavadas com PBS Glicina, permeabilizadas com PBS-Triton 0,1% e submetidas à incubação com o anticorpo primário anti-NS5A produzido em ovelha (Macdonald, Crowder *et al.*, 2003) por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS as células foram e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 594 anti-ovelha produzido em burro por 1 hora, á temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, as células foram observadas em microscópio de fluorescência para a contagem das unidades formadoras de foco e calculo do título viral pela fórmula  $F \times D \times 10$  ( $F$  = Número de focos;  $D$  = fator de diluição; 10 = Extrapolação para o volume em 1 ml, pois o volume do ensaio é de 100 uL).

## **Ensaio de replicação para o JFH1**

Células Huh 7.5 foram distribuídas em placas de 96 poços no dia anterior ao ensaio. As células foram infectadas com partículas virais da linhagem JFH1 (MOI de 0,2) por 4h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, lavadas para a remoção de partículas que não infectaram as células e subsequentemente tratadas com Fac4 (50 µM). Após 72h as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Synth) e coradas utilizando o anticorpo primário de ovelha anti-NS5A (Macdonald, Crowder *et al.*, 2003) e anticorpo secundário anti-ovelha Alexa Fluor 594. Os títulos virais foram obtidos por análise de unidades formadoras de foco. Dados foram normalizados pelo controle de DMSO e Ciclosporina A à 1 µM foi utilizada como controle positivo de inibição da replicação. Os ensaios foram realizados em triplicata, em um mínimo de três eventos.

## **Entrada Viral**

Para os experimentos de entrada viral, sobrenadante infeccioso e Fac4 foram adicionados simultaneamente às células Huh 7.5. Quatro horas após a infecção, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas e incubadas com meio fresco por 48h. DMSO e (-)-epigallocatequina galato (EGCG, Sigma-Aldrich) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As células foram fixadas e o vírus intracelular foi titulado. Ensaio foram realizados em triplicata, em um mínimo de três eventos.

## **Western Blotting**

Para detecção da presença de proteínas virais nas células tratadas com os compostos, foi realizado o ensaio de Western Blotting. Para a lise celular, foi utilizado o tampão de lise Cell Lytic (Sigma-Aldrich), enquanto que para a quantificação proteica, foi utilizado o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Dez microgramas de proteína foram separadas em SDS/PAGE e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram então bloqueadas em solução de leite em pó desnatado, a 10% em tampão salino Tris com 0.1% de Tween-20 (TBS-T). As membranas foram incubadas em anticorpo anti-NS5A produzido em ovelha (Macdonald, Crowder *et al.*, 2003), diluídos em TBS-T com 5% de leite em pó desnatado. Em seguida, após uma lavagem rápida em TBS-T, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário HRP (Horseradish Peroxidase-

conjugated) anti-ovelha. Após uma lavagem rápida em TBS-T, as membranas foram expostas ao reagente quimioluminescente ECL (enhanced chemiluminescent), que ao ser degradado pela peroxidase presente no anticorpo secundário, emite quimioluminescência que é captada pelo aparelho ChemiDoc (Bio-Rad). Após o stripping, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-GAPDH conjugado com HRP. Após exposição ao ECL, a membrana foi analisada no ChemiDoc.

### **Ensaio de Intercalação em dsRNA**

Adaptado de Krawczyk *et al.* (Krawczyk, Wasowska-Lukawska *et al.*, 2009), foi realizado um ensaio de retardo de migração para analisar a habilidade do Fac4 intercalar em RNA dupla fita (dsRNA). Uma reação de PCR foi realizada para amplificar a região 3' não traduzida (3'UTR) (Nº de acesso AB047639) utilizando *primers* flanqueados pelo sítio promotor de T7 (Forward: TAATACGACTCACTATAGGGGGCACACACTAGGTACA; Reverse: TAATACGACTCACTATAGGGACATGATCTGCAGAGAG; Regiões promotoras de T7 estão em destaque). O produto de reação (273 pb) foi purificado pelo kit Zymoclean™ Gel DNA recovery (Zymo Research) e utilizado para transcrição *in vitro* pelo kit T7 Ribomax Express (*large scale RNA production system*) (Promega). A molécula de dsRNA foi obtida pelo anelamento por complementariedade de bases e 15 nM de dsRNA foi incubado com Fac4 (50 µM), por 45 min, e analisado em gel de agarose 1% TAE 1X corado com brometo de etídeo. Uma vez que o composto, quando intercalante, compete com o brometo de etídeo, a confirmação da intercalação em dsRNA ocorre quando a banda da amostra tratada não é visualizada no gel. Doxorubicina (100 µM) foi utilizada como controle positivo de intercalação.

### **Forma de análise dos resultados**

Os dados gerados nas leituras das amostras, nos ensaios com os replicons subgenômicos e com o genoma viral completo (JFH1), foram avaliados utilizando o software *GraphPad Prism 5*, normalizando-os por sua divisão pelos valores das amostras controle contendo somente DMSO e multiplicando por cem, para obter valores em porcentagem. Média e desvio padrão foram determinados e representados

graficamente, e as análises estatísticas foram realizadas usando o teste ANOVA e o teste de múltipla comparação de Dunnett, considerando valores de  $P < 0.05$  significantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, A. Crystal structures of acridines complexed with nucleic acids. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 18, p. 1667-75, Sep 2002. ISSN 0929-8673 (Print)  
0929-8673 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171549>>.

AHLQUIST, P. et al. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. **J Virol**, v. 77, n. 15, p. 8181-6, Aug 2003. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857886>>.

AKAHANE, Y. et al. Hepatitis C virus infection in spouses of patients with type C chronic liver disease. **Ann Intern Med**, v. 120, n. 9, p. 748-52, May 1 1994. ISSN 0003-4819 (Print)  
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147548> >.

ALTER, H. J.; SEEFF, L. B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. **Semin Liver Dis**, v. 20, n. 1, p. 17-35, 2000. ISSN 0272-8087 (Print)  
0272-8087 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895429>>.

APPEL, N. et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000035, Mar 2008. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18369481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18369481)>.

ARAUJO E.S.A., S. O. S. **Hepatites na Cidade de Sao Paulo / Hepatitis in Sao Paulo City**. 2003. p.55-68

ARGENTINI, C. et al. HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. **Future Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 359-73, Apr 2009. ISSN 1746-0921 (Electronic)  
1746-0913 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327119>>.

BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Nat Prod Rep**, v. 24, n. 6, p. 1225-44, Dec 2007. ISSN 0265-0568 (Print)  
0265-0568 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18033577>>.

BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriol Rev**, v. 35, n. 3, p. 235-41, Sep 1971. ISSN 0005-3678 (Print)  
0005-3678 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4329869> >.

BARTENSCHLAGER, R.; FRESE, M.; PIETSCHMANN, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. **Advances in Virus Research**, Vol. 63, v. 63, p. 71-+, 2004. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226026000002 >.

BEHRENS, S. E.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 15, n. 1, p. 12-22, Jan 2 1996. ISSN 0261-4189 (Print)  
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598194> >.

BITTAR, C. et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits DNA damage pathway by sequestering p53 to the cytoplasm. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62581, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638118> >.

BOSON, B. et al. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. e1002144, Jul 2011. ISSN 1553-7374 (Electronic)  
1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21814513> >.

BRASIL. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções**. SAÚDE, M. D. Brasília 2011.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfeções**. SAÚDE, M. D. Brasília 2015.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v. 25, n. 3, p. 475-516, Jun 2008. ISSN 0265-0568 (Print)  
0265-0568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497896> >.

CHANDLER, D. E. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 9, p. e1002702, 2012. ISSN 1553-7358 (Electronic)  
1553-734X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028296> >.

CHANG, R. S.; YEUNG, H. W. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. **Antiviral Res**, v. 9, n. 3, p. 163-75, Apr 1988. ISSN 0166-3542 (Print)

0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840849> >.

CHANSRINIYOM, C. et al. 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)**, v. 57, n. 11, p. 1246-50, Nov 2009. ISSN 1347-5223 (Electronic) 0009-2363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881276> >.

CHATEL-CHAIX, L.; BARTENSCHLAGER, R. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. **J Virol**, v. 88, n. 11, p. 5907-11, Jun 2014. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623440> >.

CHOWDHURY, J. B. et al. Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates IRF-7-Mediated Interferon-alpha Signaling. **J Interferon Cytokine Res**, v. 34, n. 1, p. 16-21, Jan 2014. ISSN 1557-7465 (Electronic) 1079-9907 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962002> >.

CRISTINA, J.; DEL PILAR MORENO, M.; MORATORIO, G. Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. **Virus Res**, v. 127, n. 2, p. 185-94, Aug 2007. ISSN 0168-1702 (Print) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449128> >.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2006. ISBN 978-1-4051-2509-3.

CRUZ-RIVERA, M. et al. Rapid hepatitis C virus divergence among chronically infected individuals. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 629-32, Feb 2013. ISSN 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224093> >.

DAVIS, G. L. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Am J Med**, v. 107, n. 6B, p. 21S-26S, Dec 27 1999. ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653451> >.

DAVIS, G. L. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med**, v. 339, n. 21, p. 1493-9, Nov 19 1998. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819447> >.

DE VEER, M. J. et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 912-20, Jun 2001. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404376> >.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. **Curr Pharm Des**, v. 7, n. 17, p. 1703-24, Nov 2001. ISSN 1381-6128 (Print)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562307> >.

DENNY, W. A. **Chemistry of antitumour agents**. Glasgow and London: Blackie and son ltd, 1990.

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 71-99, 2007. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067278> >.

EGGER, D. et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J Virol**, v. 76, n. 12, p. 5974-84, Jun 2002. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12021330](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12021330) >.

EL-BITAR, A. M. et al. Virocidal activity of Egyptian scorpion venoms against hepatitis C virus. **Virol J**, v. 12, p. 47, 2015. ISSN 1743-422X (Electronic)

1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889296> >.

ENOMOTO, N. et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. **J Clin Invest**, v. 96, n. 1, p. 224-30, Jul 1995. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542279> >.

ENOMOTO, N. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N Engl J Med**, v. 334, n. 2, p. 77-81, Jan 11 1996. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531962> >.

FLETCHER, N. F. et al. Hepatitis C virus infection of cholangiocarcinoma cell lines. **J Gen Virol**, v. 96, n. Pt 6, p. 1380-8, Jun 2015. ISSN 1465-2099 (Electronic)  
0022-1317 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701818> >.

FRIED, M. W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v. 347, n. 13, p. 975-82, Sep 26 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic)  
0028-4793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324553> >.

FUJIWARA, M. et al. Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells. **Antiviral Res**, v. 43, n. 3, p. 189-99, Oct 1999. ISSN 0166-3542 (Print)  
0166-3542 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551376> >.

GANE, E. J. et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. **N Engl J Med**, v. 368, n. 1, p. 34-44, Jan 3 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic)  
0028-4793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23281974> >.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 12, n. 3, p. 306-17, Jun 2008. ISSN 1367-5931 (Print)  
1367-5931 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423384> >.

GAO, M. et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. **Nature**, v. 465, n. 7294, p. 96-100, May 6 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410884> >.

GERBER, L.; WELZEL, T. M.; ZEUZEM, S. New therapeutic strategies in HCV: polymerase inhibitors. **Liver Int**, v. 33 Suppl 1, p. 85-92, Feb 2013. ISSN 1478-3231 (Electronic)  
1478-3231 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23286851> >.

GHANY, M. G. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1433-44, Oct 2011. ISSN 1527-3350 (Electronic)  
0270-9139 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21898493> >.

GONZALEZ-PERALTA, R. P. et al. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. **J Med Virol**, v. 49, n. 3, p. 242-7, Jul 1996. ISSN 0146-6615 (Print)

0146-6615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818972> >.

GOSERT, R. et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5487-92, May 2003. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692249> >.

GRIFFIN, S. D. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett**, v. 535, n. 1-3, p. 34-8, Jan 30 2003. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560074> >.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, Oct 2008. ISSN 1359-6446 (Print)

1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691670> >.

HONEGGER, J. R. et al. Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1529-33, Nov 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162814> >.

HOOFNAGLE, J. H. et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. **N Engl J Med**, v. 315, n. 25, p. 1575-8, Dec 18 1986. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097544> >.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137-43, Jun 2003. ISSN 1045-1056 (Print)

1045-1056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770546> >.

HOUGHTON, M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. **J Hepatol**, v. 51, n. 5, p. 939-48, Nov 2009. ISSN 1600-0641 (Electronic)

0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781804> >.

HUDSON, J. B. Plant photosensitizers with antiviral properties. **Antiviral Res**, v. 12, n. 2, p. 55-74, Sep 1989. ISSN 0166-3542 (Print)

0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2688551> >.

ITOIGAWA, M. et al. Cancer chemopreventive activity of acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 193, n. 2, p. 133-8, Apr 25 2003. ISSN 0304-3835 (Print)

0304-3835 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706869> >.

JACOBSON, I. M. et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. **N Engl J Med**, v. 368, n. 20, p. 1867-77, May 16 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607593> >.

JONES, C. T. et al. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **J Virol**, v. 81, n. 16, p. 8374-83, Aug 2007. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537845> >.

KANDA, T. et al. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. **J Virol**, v. 80, n. 9, p. 4633-9, May 2006. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611923> >.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta Med Okayama**, v. 55, n. 3, p. 133-59, Jun 2001. ISSN 0386-300X (Print)

0386-300X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434427> >.

KATO, T. et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1808-17, Dec 2003. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724833> >.

KIM, S. et al. Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. **J Virol**, v. 85, n. 13, p. 6645-56, Jul 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525356> >.

KITAZATO, K.; WANG, Y.; KOBAYASHI, N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. **Drug Discov Ther**, v. 1, n. 1, p. 14-22, Aug 2007. ISSN 1881-7831 (Print)

1881-7831 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504360> >.

KOHLI, A. et al. Treatment of hepatitis C: a systematic review. **JAMA**, v. 312, n. 6, p. 631-40, Aug 13 2014. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117132> >.

KOVALENKO, A. L. et al. [Intracellular localization of cycloferon, its binding with DNA and stimulation of cytokines expression after exposure to cycloferon]. **Tsitologiya**, v. 42, n. 7, p. 659-64, 2000. ISSN 0041-3771 (Print)

0041-3771 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10994082> >.

KRAWCZYK, M. et al. Amidinoanthracyclines - a new group of potential anti-hepatitis C virus compounds. **Biol Chem**, v. 390, n. 4, p. 351-60, Apr 2009. ISSN 1431-6730 (Print)

1431-6730 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19199832> >.

LAM, A. M. et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3359-68, Jun 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430955> >.

LAWITZ, E. et al. Sofosbuvir in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin for non-cirrhotic, treatment-naïve patients with genotypes 1, 2, and 3 hepatitis C infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 401-8, May 2013. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499158> >.

LAWITZ, E. et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 515-23, Feb 8 2014. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24209977> >.

LE GUILLOU-GUILLEMETTE, H. et al. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 17, p. 2416-26, May 7 2007. Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17552024](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17552024) >.

LEMON, S. M. et al. Hepatitis C virus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781760607 (alk. paper)

0781760607 (alk. paper).

LI, H. C. et al. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7104-7122, Jun 21 2014. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000338519800003 >.

LI, Y. et al. The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 9, p. 544-58, Sep 2015. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256788> >.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933-8, Aug 18 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107832> >.

LOHMANN, V. et al. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. **J Virol**, v. 71, n. 11, p. 8416-28, Nov 1997. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343198> >.

LU, H. et al. Detection of hepatitis C virus RNA sequences in cholangiocarcinomas in Chinese and American patients. **Chin Med J (Engl)**, v. 113, n. 12, p. 1138-41, Dec 2000. ISSN 0366-6999 (Print) 0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776153> >.

MA, Y. et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. **J Virol**, v. 85, n. 1, p. 86-97, Jan 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962101> >.

MACDONALD, A. et al. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 17775-84, May 16 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621033> >.

MANFRONI, G. et al. Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replication by acridone derivatives: identification of an NS3 helicase inhibitor. **J Med Chem**, v. 52, n. 10, p. 3354-65, May 28 2009. ISSN 1520-4804 (Electronic) 0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388645> >.

MANNS, M. P. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 958-65, Sep 22 2001. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583749> >.

MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol**, v. 66, n. 5, p. 3225-9, May 1992. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313927> >.

MATSUNAGA, H. et al. Isolation and structure of vanitaracin A, a novel anti-hepatitis B virus compound from Talaromyces sp. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 19, p. 4325-8, Oct 1 2015. ISSN 1464-3405 (Electronic)  
0960-894X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26271586> >.

MCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-22, Jul 2007. ISSN 0031-9422 (Print)  
0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574638> >.

MCHUTCHISON, J. G. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med**, v. 339, n. 21, p. 1485-92, Nov 19 1998. ISSN 0028-4793 (Print)  
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819446> >.

MCPHEE, F. et al. Virological escape in HCV genotype-1-infected patients receiving daclatasvir plus ribavirin and peginterferon alfa-2a or alfa-2b. **Antivir Ther**, v. 19, n. 5, p. 479-90, 2014. ISSN 2040-2058 (Electronic)  
1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24448487> >.

MIYANARI, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1089-U74, Sep 2007. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249256500017 >.

MIZOKAMI, M. et al. Interferon-alpha therapy exerts selective pressure on hepatitis C virus quasispecies equilibrium. **Antivir Ther**, v. 4, n. 1, p. 15-9, 1999. ISSN 1359-6535 (Print)  
1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10682124> >.

MORIKAWA, K. et al. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. **J Viral Hepat**, v. 18, n. 5, p. 305-15, May 2011. ISSN 1365-2893 (Electronic)  
1352-0504 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470343> >.

MULLER, V. D. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383618> >.

MUNIR, S. et al. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. **Virology**, v. 7, p. 296, 2010. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040548> >.

MURPHY, D. et al. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatology**, v. 46, p. 623A, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-77, Mar 2007. ISSN 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309302> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, v. 17, n. 3, p. 215-34, Jun 2000. ISSN 0265-0568 (Print) 0265-0568 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888010> >.

NIEPMANN, M. Hepatitis C virus RNA translation. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 369, p. 143-66, 2013. ISSN 0070-217X (Print) 0070-217X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463200> >.

OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. **Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application**. Springer Science & Business Media, 2009. 597 ISBN 0387854983, 9780387854984.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 299, p. 261-84, 2006. ISSN 0070-217X (Print) 0070-217X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568902> >.

PAWLOTSKY, J. M.; CHEVALIEZ, S.; MCHUTCHISON, J. G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1979-1998, May 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000246456400038 >.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5-19, Jan 2004. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=14752815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14752815) >.

PERUMAL, V. et al. Hepatitis C and hepatitis B nucleic acids are present in intrahepatic cholangiocarcinomas from the United States. **Hum Pathol**, v. 37, n. 9, p. 1211-6, Sep 2006. ISSN 0046-8177 (Print)

0046-8177 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938527> >.

PICCININNI, S. et al. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 45670-9, Nov 22 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235135> >.

PLAZA, Z. et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. **Antivir Ther**, v. 17, n. 5, p. 921-6, 2012. ISSN 2040-2058 (Electronic)

1359-6535 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436385> >.

POPESCU, C. I. et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 2, p. e1001278, 2011. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347350> >.

POVEDA, E. et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. **Antiviral Res**, v. 108, p. 181-91, Aug 2014. ISSN 1872-9096 (Electronic)

0166-3542 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911972> >.

POYNARD, T. et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v. 352, n. 9138, p. 1426-32, Oct 31 1998. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807989> >.

PRECIADO, M. V. et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 43, p. 15992-16013, Nov 21 2014. ISSN 2219-2840 (Electronic)

1007-9327 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473152> >.

RALPHS, S.; KHAN, S. A. The role of the hepatitis viruses in cholangiocarcinoma. **J Viral Hepat**, v. 20, n. 5, p. 297-305, May 2013. ISSN 1365-2893 (Electronic)

1352-0504 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565610> >.

RALSTON, R.; JACOBSON, I.; SCULL, M. The conundrum of relapse in STAT-C therapy: does HCV play the Red Queen or Rip Van Winkle? **Semin Liver Dis**, v. 31, n. 4, p. 410-9, Nov 2011. ISSN 1098-8971 (Electronic)

0272-8087 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189980>>.

RAMIREZ-CARRETO, S. et al. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. **Peptides**, v. 73, p. 51-59, Sep 4 2015. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352292>>.

RANEY, K. D. et al. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. **J Biol Chem**, v. 285, n. 30, p. 22725-31, Jul 23 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457607>>.

RAYCHOUDHURI, A. et al. Hepatitis C virus infection impairs IRF-7 translocation and Alpha interferon synthesis in immortalized human hepatocytes. **J Virol**, v. 84, n. 21, p. 10991-8, Nov 2010. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810735>>.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, May 22 2008. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474274>>.

ROMEO, R.; RUMI, M.; COLOMBO, M. Alpha interferon treatment of chronic hepatitis C. **Biomed Pharmacother**, v. 49, n. 3, p. 111-5, 1995. ISSN 0753-3322 (Print)

0753-3322 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647281>>.

ROSENQUIST, A. et al. Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. **J Med Chem**, v. 57, n. 5, p. 1673-93, Mar 13 2014. ISSN 1520-4804 (Electronic)

0022-2623 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446688>>.

SAKAI, A. et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11646-51, Sep 30 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504405>>.

SCHREGEL, V. et al. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5342-7, Mar 31 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282477>>.

SEEFF, L. B. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). **Liver Int**, v. 29 Suppl 1, p. 89-99, Jan 2009. ISSN 1478-3231 (Electronic)

1478-3223 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207971>>.

SEPULVEDA, C. S. et al. Acridones as antiviral agents: synthesis, chemical and biological properties. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 2402-14, 2013. ISSN 1875-533X (Electronic)

0929-8673 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521684>>.

SEPULVEDA, C. S. et al. Synthesis and evaluation of N-substituted acridones as antiviral agents against haemorrhagic fever viruses. **Antivir Chem Chemother**, v. 19, n. 1, p. 41-7, 2008. ISSN 0956-3202 (Print)

0956-3202 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18610557>>.

SHIRATORI, Y. et al. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. **Gastroenterology**, v. 113, n. 2, p. 558-66, Aug 1997. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247476>>.

SIMISTER, P. et al. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. **J Virol**, v. 83, n. 22, p. 11926-39, Nov 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740982>>.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962-73, Oct 2005. Disponível em:

<  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16149085](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16149085)>.

SIMMONDS, P. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J Gen Virol**, v. 74 ( Pt 11), p. 2391-9, Nov 1993. ISSN 0022-1317 (Print)

0022-1317 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245854>>.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 1006-15, Mar 30 2006. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412984>>.

STANKIEWICZ-DROGON, A. et al. Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibit subgenomic HCV replication. **J Med Chem**, v. 53, n. 8, p. 3117-26, Apr 22 2010. ISSN 1520-4804 (Electronic)

0022-2623 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337460>>.

STANKIEWICZ-DROGON, A. et al. New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 19, p. 8846-52, Oct 1 2008. ISSN 1464-3391 (Electronic)

0968-0896 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801660>>.

STEINMANN, E. et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e103, Jul 2007. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658949>>.

STORCH, E. et al. Production of interferon-beta by murine T-cell lines induced by 10-carboxymethyl-9-acridanone. **Scand J Immunol**, v. 23, n. 2, p. 195-9, Feb 1986. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3081999>>.

SUZUKI, T. et al. Hepatitis C viral life cycle. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 12, p. 1200-12, Oct 10 2007. ISSN 0169-409X (Print)

0169-409X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825945>>.

TABARRINI, O. et al. Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents. **J Med Chem**, v. 49, n. 8, p. 2621-7, Apr 20 2006. ISSN 0022-2623 (Print)

0022-2623 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610805>>.

TABBA, H. D.; CHANG, R. S.; SMITH, K. M. Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. **Antiviral Res**, v. 11, n. 5-6, p. 263-73, Jun-Jul 1989. ISSN 0166-3542 (Print)

0166-3542 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2802570>>.

TAKEMURA, Y. et al. Studies on the inhibitory effects of some acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation. **Planta Med**, v. 61, n. 4, p. 366-8, Aug 1995. ISSN 0032-0943 (Print)

0032-0943 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480187> >.

TANG, H.; GRISE, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 2, p. 49-65, Jul 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515018> >.

TELLINGHUISEN, T. L.; FOSS, K. L.; TREADAWAY, J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000032, Mar 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369478> >.

TOYODA, H. et al. Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon. **J Hepatol**, v. 26, n. 1, p. 6-13, Jan 1997. ISSN 0168-8278 (Print)

0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148023> >.

TURPIN, J. A. et al. Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 3, p. 487-94, Mar 1998. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9517921> >.

WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med**, v. 11, n. 7, p. 791-6, Jul 2005. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951748> >.

WANG, C.; SARNOW, P.; SIDDIQUI, A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. **J Virol**, v. 67, n. 6, p. 3338-44, Jun 1993. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388503> >.

WIELAND, S. et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2121-30, Jun 2014. ISSN 1527-3350 (Electronic)

0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122862> >.

WOZNIAK, A. L. et al. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 9, p. e1001087, 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824094> >.

WYLES, D. L. et al. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2660-2, Jun 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289518> >.

YAMAMOTO, N. et al. Anti-herpesvirus activity of citrussinine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. **Antiviral Res**, v. 12, n. 1, p. 21-36, Aug 1989. ISSN 0166-3542 (Print)

0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556960> >.

YAO, N. et al. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. **Structure**, v. 7, n. 11, p. 1353-63, Nov 15 1999. ISSN 0969-2126 (Print)

0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574797> >.

YAO, X. J.; WAINBERG, M. A.; PARNIAK, M. A. Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris*. **Virology**, v. 187, n. 1, p. 56-62, Mar 1992. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371029> >.

YIN, F.; CHEN, B. Detection of hepatitis C virus RNA sequences in hepatic portal cholangiocarcinoma tissue by reverse transcription polymerase chain reaction. **Chin Med J (Engl)**, v. 111, n. 12, p. 1068-70, Dec 1998. ISSN 0366-6999 (Print)

0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263365> >.

# **CAPÍTULO II**

## **Hepatitis C Virus *in vitro* replication is efficiently inhibited by Acridone**

Campos, G. R. F.<sup>1</sup>; Bittar, C.<sup>1</sup>; Jardim, A. C. G.<sup>2</sup>; Shimizu, J. F.<sup>1</sup>; Paganini, E. R.<sup>1</sup>; Regasini, L. O.<sup>1</sup>; Rahal, P.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Genomics Study Laboratory, São Paulo State University, IBILCE, S. José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Science, ICBIM, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

### **Abstract**

Hepatitis, given name for liver inflammations, can be caused by viral infections. Hepatitis C, caused by Hepatitis C Virus (HCV), affects about 170 million people worldwide. HCV belongs to Flaviviridae family, has a positive single stranded RNA genome that codifies a polyprotein, which is cleaved by host and viral proteases, resulting in 10 viral proteins. The current treatment, based on Interferon and the new Direct Acting Antivirals, has a high cost and variable response rates according to the virus genotype. Acridones, a group of compounds extracted from natural sources, showed potential antiviral actions against HCV, however their possible antiviral activity have been poorly explored in cell culture. Thus, this study aimed to evaluate the influence of a panel of 14 synthetic acridones on HCV life cycle. The compounds were screened using Huh 7.5 cell line expressing the HCV subgenomic replicon SGR-JFH1-FEO. Cells were incubated in the presence and absence of compounds for 72 hours. Cell viability and replication levels were accessed by MTT and luciferase assays, respectively. The Acridone Fac4 presented a replication inhibition of approximately 90 % at 50  $\mu$ M and 100 % of cell viability. The acridone Fac4 was selected for the follow-up experiments. The effect of Fac4 was evaluated in the replication and entry steps using Huh 7.5 cells infected with viral particles from JFH-1 strain produced in laboratory (HCVcc). Fac4 inhibited the replication of JFH-1 by approximately 70 %, while no effect was observed on virus entry. The expression of the viral protein NS5A was evaluated by Western Blotting assay and was undetectable in Fac4 treated sample, corroborating previous results. Despite these results, no inhibitory effect was observed against genotype 3 replication. Some acridones are known to intercalate in dsRNA molecules, which are replication intermediates, disrupting replication. We performed a dsRNA intercalation

assay in order to test if this is the mode of action of this compound. Fac4 showed no intercalation activity. Further experiments are necessary to evaluate how Fac4 interferes in HCV replication.

Keywords: HCV. Treatment. Acridones.

## Introduction

Hepatitis C is a global health problem, widely distributed, that affects approximately 170 million people around the world (Alter e Seeff, 2000; Houghton, 2009). Hepatitis C Virus (HCV), the causative agent of this disease, is a single stranded RNA positive genome virus that belongs to *Flaviviridae* family and is classified as a group IV virus, according to Baltimore classification (Baltimore, 1971; Penin, Dubuisson *et al.*, 2004). With a genome of 9.6 kb, flanked by 3' and 5' untranslated regions, the open reading frame codifies a polyprotein of about 3000 amino acids (Suzuki, Ishii *et al.*, 2007). Viral and host proteases cleave this polyprotein, originating 3 structural proteins (Core, E1 and E2) and 7 non-structural proteins (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) (Penin, Dubuisson *et al.*, 2004; Lindenbach e Rice, 2005; Dustin e Rice, 2007).

Due to the high genetic variability, derived mainly from the absence of corrective activity of RNA-dependent RNA polymerase NS5B and high replication rate during infection (Argentini, Genovese *et al.*, 2009), HCV is divided into genotypes (1 to 7) and subtypes (classified by lowercase letters – a, b, c) (Simmonds, Holmes *et al.*, 1993; Simmonds, Bukh *et al.*, 2005; Murphy, Chamberland *et al.*, 2007). Furthermore, in an infected individual it circulates as a pool of variants genetically related, with less than 5% of genome difference, called quasispecies (Martell, Esteban *et al.*, 1992; Davis, 1999). The presence of closely related strains provides a favorable environment for the emergence of resistance mutations that is sufficient to generate drug resistance (Pawlotsky, 2006; Cristina, Del Pilar Moreno *et al.*, 2007). Therefore, the quasispecies nature of HCV has a direct impact in the effectiveness of treatment with usual medications, as well as the development of new antivirals (Le Guillou-Guillemette, Vallet *et al.*, 2007).

In 1986 (before the discovery of Hepatitis C etiological agent), interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) was used for treatment as a monotherapy, with a sustained virological response (SVR) of 20% to 30% (Hoofnagle, Mullen *et al.*, 1986; Romeo, Rumi *et al.*, 1995; Shiratori, Kato *et al.*, 1997). To increase the efficiency of treatment, INF- $\alpha$  was combined with Ribavirin, reaching an SVR of

60% for genotypes 2 and 3 and 40% for genotype 1 (Davis, Esteban-Mur *et al.*, 1998; Mchutchison, Gordon *et al.*, 1998; Poynard, Marcellin *et al.*, 1998; Kato, 2001). Later, the association of interferon with polyethylene glycol (pegINF) applied with ribavirin elevated SVR by approximately 40% (Manns, Mchutchison *et al.*, 2001; Fried, Shiffman *et al.*, 2002).

Currently, with the development of the Direct Acting Antivirals (DAAs) including protease, NS5A and polymerase inhibitors, the more effective treatment is a therapy of the DAAs with or without pegINF- $\alpha$  and Ribavirin (Gao, Nettles *et al.*, 2010; Lawitz, Lalezari *et al.*, 2013; Rosenquist, Samuelsson *et al.*, 2014). Treatment strategy is designed based on virological, clinical and liver pathology aspects. The SVR is variable and dependent on virus genotype and the stage of liver disease. Jacobson *et al.* evaluated two groups of patients during 12 weeks of treatment with Sofosbuvir and Ribavirin. The group infected with genotype 2 presented around 90% of SVR, while patients infected with genotype 3 showed only 61% of SVR (Jacobson, Gordon *et al.*, 2013). It also must be considered the several side effects observed like anemia, autoimmune disorders, diarrhea, rash, retinopathy and weight loss, as well as the elevated cost (Munir, Saleem *et al.*, 2010).

Through human history, plants have been used for the treatment of many diseases. Today, many drugs are derived from natural sources such as aspirin (*Salix alba*) and morphine (*Papaver somniferum*) (Newman, Cragg *et al.*, 2000). Among the natural compounds, acridones are derived from acridines and have shown several chemical and biological properties (Denny, 1990; Demeunynck, Charmantray *et al.*, 2001). The antiviral action of acridones is well known in literature against HSV-2 and CMV replication and inhibiting HIV-1 transcription (Yamamoto, Furukawa *et al.*, 1989; Turpin, Buckheit *et al.*, 1998; Fujiwara, Okamoto *et al.*, 1999). Recent studies revealed the potential anti-HCV effect of acridone derivatives as NS3 helicase inhibitor and as dsRNA intercalant, inhibiting viral replication (Stankiewicz-Drogon, Palchykovska *et al.*, 2008; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010).

Recently, pharmaceutical companies chosen to use synthetic compounds derived from natural products in drugs screening (Newman e Cragg, 2007; Butler, 2008; Ganesan, 2008; Harvey, 2008). Although natural products are, in general, absorbed faster due to its lower molar mass, when compared to their synthetic derivatives (Ganesan, 2008; Harvey, 2008), the tendency for synthetics occurred mainly due to the difficult access to natural products, complexity of large-scale production and concern with intellectual property rights, since natural compounds cannot

be patented. Additionally, the laboratory synthesis allowed the creation of compounds libraries from chemistry combination methods, favoring the discovery of new drugs in a shorter period of time (Singh e Barrett, 2006; Baker, Chu *et al.*, 2007; Mcchesney, Venkataraman *et al.*, 2007; Rishton, 2008).

Considering the high cost and side effects of current Hepatitis C treatment, the development of new drugs against remains an important subject of research. The aim of this study was to investigate the effects of synthetic acridones on HCV life cycle by the use of *in vitro* approaches.

## **Materials and Methods**

### **Compounds synthesis**

All compounds used in this work were synthesized in the Laboratory of Medicinal and Green Chemistry of São Paulo State University (UNESP), Campus of São José do Rio Preto city, under the supervision of Prof. Luis Octavio Regasini.

The preparation of acridones was made by a condensation reaction between anthranilic acid and phloroglucinols derivatives, in the presence of p-toluenesulfonic acid and 1-hexanol as solvent and catalyst, respectively. A panel of 13 acridones (Fac1-Fac6 and Fac14-Fac21) and a benzoacridone (Fac22) were obtained.

### **Constructs**

For initial screening of compounds by their effects on the replication step, the HCV subgenomic replicon SGR-Feo-JFH1 was used (Wyles, Kaihara *et al.*, 2009). This construct carries the phosphotransferase luciferase-neomycin fusion gene. To evaluate if the inhibitory effect is genotype-specific, the genotype 3 subgenomic replicon S52/SG-Feo was used (Saeed, Scheel *et al.*, 2012). For replication, entry and western blotting analysis, infection assays were carried out with full length HCV JFH-1 isolate (Wakita, Pietschmann *et al.*, 2005) (**Figure 1**).

### **Cell culture**

Huh 7.5 cells and Huh 7.5 stably expressing subgenomic replicons SGR-JFH1-FEO and S52/SG-Feo were cultured in Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM; Sigma-Aldrich)

supplemented with 100 IU penicillin ml<sup>-1</sup>, 100 µg streptomycin ml<sup>-1</sup>, 10% fetal calf serum and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### **Experimental delineation for initial screening**

An initial screening was performed to test the compounds for antiviral activity on HCV replication. Drugs were diluted in DMSO (Dimethyl sulfoxide – Sigma Aldrich). For each compound, cytotoxicity and replication assays were performed. Huh 7.5 cells expressing SGR-JFH1-FEO were seeded in 96 well plates at the density of 3 x 10<sup>3</sup> and incubated in the presence or absence of compounds for 72h. Cyclosporine A at 1 µM was used as a positive control for replication inhibition and DMSO 0.1% as non-treated control. Assays were performed in triplicates and a minimum of three times. Four concentrations were tested (50 µM, 10 µM, 2 µM and 0,4 µM).

### **Replication assay for subgenomic replicons**

After treatment, cells were harvested with Passive Lysis Buffer (PLB) (Promega). Replication levels were quantified by measuring luciferase activity with Luciferase Assay System (Promega) in a microplate reader (FLUOstar Omega – BMG Labtech). Data was normalized by DMSO control.

### **Cytotoxicity assay**

After 72h the media was removed, cells were incubated at 37°C with DMEM containing MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml. After 30 minutes MTT was removed and 100 µl of DMSO was added to solubilize formazan crystals. Cell viability was determined by measuring optical density in the microplate reader. After treatment, compounds were considered non-toxic when cells presented viability over 90%.

### **Effective Concentration 50% (EC50)**

The effective concentration 50% (EC50) was calculated using Prism (GraphPad) and cytotoxicity assays were carried out in parallel to determine the cytotoxic concentration 50% (CC50) using a MTT-based system as described above. The values of CC50 and EC50 were used to calculate the selectivity index (SI = CC50/EC50), which suggests the potential antiviral activity of the compounds.

## **Viral production**

HCV JFH1 RNA was electroporated in Huh 7.5 cells at 270 V, 950  $\mu$ F and  $\infty$  resistance, using a 4 mm cuvette (Gene Pulser Xcell Electroporation System – Bio-Rad). Fifteen days after electroporation supernatant was collected, concentrated with PEG 8000 (Polyethylene glycol) (Sigma-Aldrich) and titrated.

## **Replication assay for JFH1**

Huh 7.5 cells were seeded in 96 well plates the day before the assay. Cells were infected with JFH1 virus (MOI of 0.2) for 4 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, washed extensively to remove virus and subsequently treated with Fac4 (50 $\mu$ M). After 72 h cells were fixed with 4% PFA (Synth) and stained for NS5A using sheep anti-NS5A (Macdonald, Crowder *et al.*, 2003) and Alexa Fluor anti-sheep 594 secondary antibody. Virus titers were obtained by focus formation units analysis. Data was normalized by DMSO control and Cyclosporine at 1 $\mu$ M was used as a control of inhibition of replication. Assays were performed in triplicate and a minimum of three times.

## **Viral entry**

For virus entry experiments, infectious supernatant and Fac4 were added simultaneously to Huh-7.5 cells. Four hours post-infection (h.p.i), supernatant was removed, washed extensively and replaced with fresh medium. Cells were incubated for 48 hours. DMSO and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG, Sigma-Aldrich) were used as control negative and positive controls, respectively. Cells were fixed and intra cellular virus was titrated. Assays were performed in triplicate and a minimum of three times.

## **Western blotting**

Cells were lysed using Cell Lytic (Sigma-Aldrich) and protein was quantified with Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), following the manufacturers protocol. Approximately 10  $\mu$ g of protein was resolved in SDS-PAGE electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with nonfat milk 10% in TBS-T solution. The membrane was probed at 4°C with sheep Anti-NS5A antibody overnight (Macdonald, Crowder *et al.*, 2003) and then with secondary Anti-sheep IgG antibody conjugated with HRP (Sigma-Aldrich) at room temperature for 1h. The membrane was washed in TBS-T, exposed to ECL (Enhanced Chemiluminescent) and chemiluminescence was captured by ChemiDoc equipment (Bio-Rad).

After stripping, membrane was probed for 1h at room temperature with Anti-GAPDH antibody conjugated with HRP. After exposure to ECL, the blotting was analyzed in ChemiDoc.

### **dsRNA intercalation assay**

Adapted from Krawczyk *et al.* (Krawczyk, Wasowska-Lukawska *et al.*, 2009), a migration retardation assay was performed, aiming to analyze Fac4 ability to intercalate in dsRNA. A PCR reaction was made to amplify the HCV JFH1 3' untranslated region (UTR) (accession no. AB047639) using primers flanked by T7 promoter site (Forward: TAATACGACTCACTATAGGGGGCACACACTAGGTACA; Reverse: TAATACGACTCACTATAGGGACATGATCTGCAGAGAG; T7 promoter regions are underlined). The reaction product (273 bp) was purified by Zymoclean™ Gel DNA recovery Kit (Zymo Research) and was used for *in vitro* transcription by the T7 Ribomax Express kit (large scale RNA production system) (Promega). The dsRNA molecule was obtained by complementary annealing and incubated at 15 nM with Fac4 (50µM), for 45 min, and analyzed in 1% agarose 1X TAE gel stained with ethidium bromide. Since an intercalating compound competes with ethidium bromide, intercalation of dsRNA is confirmed when the band of the treated sample is not visualized in the gel. Doxorubicin (100µM) was used as positive control of intercalation.

### **Data analysis**

All data originated from cytotoxicity assays, replication assays for subgenomic replicon and complete viral genome (JFH1) and virus entry were evaluated using software GraphPad Prism 5. Average and standard deviation were represented in each graph. Statistical analyses were done using ANOVA test and Dunnett's Multiple Comparison Test, considering  $P < 0.05$  as significant. Data was normalized by dividing by its controls and multiplying by a hundred to obtain values in percentage.

## Results

### Fac4 activity against JFH1 replication

We performed a screening with the acridones to select those with potential antiviral activity on HCV replication. Huh 7.5 cells stably expressing SGR-Feo-JFH1 were treated with compounds at 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ M and 0,4  $\mu$ M. After 72 h incubation, luciferase and MTT assays were performed in parallel to evaluate the replication inhibition and cell viability under the treatment with the compounds, respectively. From all the sixteen acridones and one benzoacridone tested, Fac4 presented a significant activity against HCV replication. This acridone at 50  $\mu$ M presented cell viability of 100% (**Figure 2A**) with inhibition of viral replication by approximately 90% (**Figure 2B**). Fac4 inhibited replication in a dose-dependent manner (data not shown) with  $EC_{50}$  of 33.85  $\mu$ M and SI ( $CC_{50}/EC_{50}$ ) of 3.47. The acridone Fac4 was therefore selected to proceed to further experiments. Concentrations over 50  $\mu$ M were tested, however, demonstrated to be cytotoxicic (data not shown). On the other hand, some acridones (Fac6, Fac18, Fac20, Fac21 and Fac22) increased the level of replication, nearly doubling the value when compared to the control (**Figure 2B**).

We then evaluate the effects Fac4 in the context of full length virus. Huh 7.5 cells were infected with JFH1 HCV particles and after 4h, viral supernatant was removed and cells were treated with Fac4 for 72 hours. Cells were fixed, stained and titrated. Fac4 inhibited HCV replication in approximately 70% (**Figure 3A**), showing the potential antiviral activity against HCV. Protein expression levels were also significantly reduced in the presence of Fac 4. The result observed corroborated with previous replication tests, since NS5A was undetectable when cells were treated with Fac4 (**Figure 3B**).

### Fac4 as a dsRNA intercalator.

To further investigate the antiviral action against HCV replication by Fac4, we analyzed the capacity of this compound to intercalate in dsRNA. Using the of 3'UTR region of JFH1 HCV as a template, we produced an amplicon flanked by T7 promoter that was used for *in vitro* transcription, synthesizing a dsRNA molecule of 273 bp. This dsRNA was incubated with Fac4 at 50 $\mu$ M or controls (DMSO 0.1% and Doxorubicin at 100 $\mu$ M) and was analyzed by a migration retardation assay. As observed, Fac4 presented no intercalation property, since the dsRNA sample treated with this compound was stained by ethidium bromide and was detected

when exposed to ultraviolet light (**Figure 3C**). Notice that the sample treated with Doxorubicin (positive control of intercalation) does not appear in the image, reasserting the observed result.

**Fac4 does not act in viral entry.**

To evaluate whether Fac4 possess antiviral activity on HCV entry stage, Huh 7.5 cells were infected with JFH1 HCV particles in the presence or absence of Fac4 for 4 h. Viral inoculum was replaced by fresh media and intracellular virus was quantified 72 h.p.i.. No blockage of viral entry was observed (**Figure 4**).

**Fac4 has no activity against genotype 3 replication.**

Once Fac4 presented a potential inhibition of HCV JFH1 replication, we decided to observe if these results are genotype-specific. Huh 7.5 cells stably expressing the genotype 3 subgenomic replicon S52/SG-Feo were treated with Fac4, at 50  $\mu$ M, and replication levels were analyzed by luciferase assay. As can be seen, no inhibition of genotype 3 replication was observed (**Figure 5**).

## Discussion

The antiviral effects of acridones are well described in literature, and the activity spectrum of this class of compounds varies depending on the type of viral genome (double-stranded DNA genome or RNA viruses) (Sepulveda, Fascio *et al.*, 2013). For DNA genome viruses, some acridones extracted from Rutaceous plants showed great antiviral activity against herpes simplex virus serotypes 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2), human cytomegalovirus (HCMV) and Epstein-Barr virus (Yamamoto, Furukawa *et al.*, 1989; Takemura, Ju-Ichi *et al.*, 1995; Itoigawa, Ito *et al.*, 2003; Chansriniyom, Ruangrunsi *et al.*, 2009). For RNA viruses, acridones presented activity against HIV-1, bovine viral diarrhea virus (BVDV), all serotypes of dengue virus (DENV) and HCV, the last three belonging to the *Flaviviridae* family (Turpin, Buckheit *et al.*, 1998; Fujiwara, Okamoto *et al.*, 1999; Houe, 2003; Tabarrini, Manfroni *et al.*, 2006; Sepulveda, Fascio *et al.*, 2008; Stankiewicz-Drogon, Palchykovska *et al.*, 2008; Raney, Sharma *et al.*, 2010; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010; Mazzucco, Talarico *et al.*, 2015).

Our results showed that acridone Fac4 inhibited 90% and 75% of HCV replication in the context of subgenomic replicon and JFH1 HCVcc infected cells, respectively. Also, NS5A viral protein expression was reduced by treatment with this compound. The difference of inhibition in these two assays can be explained by the different systems used in each case (stable cell lines and infected cells).

Despite the replication inhibition observed, Fac4 had no antiviral activity on HCV viral entry. This could be explained by the way acridones act against infection. Some authors argue that their nucleic acid intercalation ability and interaction with viral enzymes are the main mechanisms by which these compounds can act (Adams, 2002; Stankiewicz-Drogon, Palchykovska *et al.*, 2008; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010). For HCV, data presented by Stankiewicz-Drogon and co-workers (Stankiewicz-Drogon, Palchykovska *et al.*, 2008; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010) reinforces this assumption. Acridones showed inhibition of NS3 helicase, T7 RNA polymerase (topology and function similar to HCV NS5B) and strong double-stranded RNA intercalation property. All these elements are involved in replication step and it is plausible the absence of activity on HCV entry step, since Fac4 was incubated only with JFH1 viral particle, and had no contact with viral genome or viral enzymes during this procedure, which are respectively released and synthesized inside cells.

It is not clear yet if there is a combination of these effects on the replication inhibition. Some acridones presented dsRNA intercalation property, others showed inhibition of NS3 helicase and NS5B polymerase, and some presented both effects (Manfroni, Paeshuyse *et al.*, 2009; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010). However, all the assays were performed isolated, evaluating inhibition of enzymatic activity or dsRNA intercalation individually. According to our results, Fac4 has no intercalation capacity. Therefore, replication inhibition by Fac4 may be related to an enzymatic inhibition of NS3 or NS5B, given that this process was been observed not only for HCV replication, but also for BVDV (Tabarrini, Manfroni *et al.*, 2006; Stankiewicz-Drogon, Palchykovska *et al.*, 2008; Stankiewicz-Drogon, Dorner *et al.*, 2010). This hypothesis remains to be investigated.

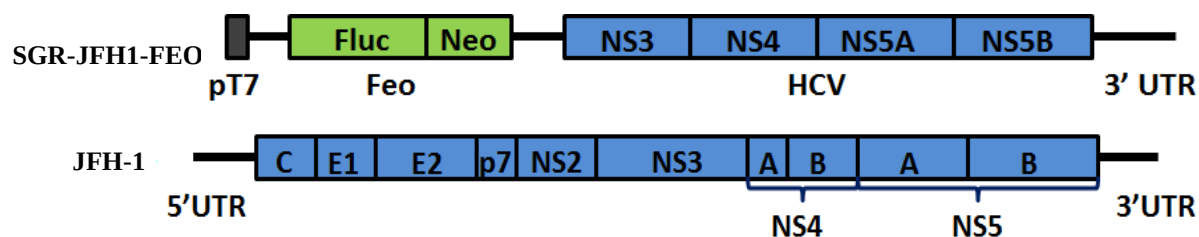
Considering that the enzymatic inhibition hypothesis is occurring, and Fac4 is inhibiting replication by this pathway, we could comprehend better why Fac4 inhibits HCV genotype 2 replication while no activity is observed for genotype 3. Some recent approved DAAs that target NS3, such as Simeprevir and Grazoprevir, are efficient against almost all genotypes, except genotype 3 (Summa, Ludmerer *et al.*, 2012; Gentile, Buonomo *et al.*, 2014; Hayashi, Izumi *et al.*, 2014; Rosenquist, Samuelsson *et al.*, 2014), and for NS5B inhibitor Dasabuvir, for example, inhibitory activity is even more restricted, being observed only against genotype 1 (Cento, Chevaliez *et al.*, 2015).

Another possible explanation for antiviral activity of Fac4 is the targeting of cellular components. Some acridone derivatives, such as Cycloferon (CMA), are described as molecules which can induce interferon pathway (Storch, Kirchner *et al.*, 1986; Kovalenko, Kazakov *et al.*, 2000). Tracking the entry of Fac4 and the place where it accumulates is essential to understand if Fac4 acts only against HCV components or if there is influence in cell elements.

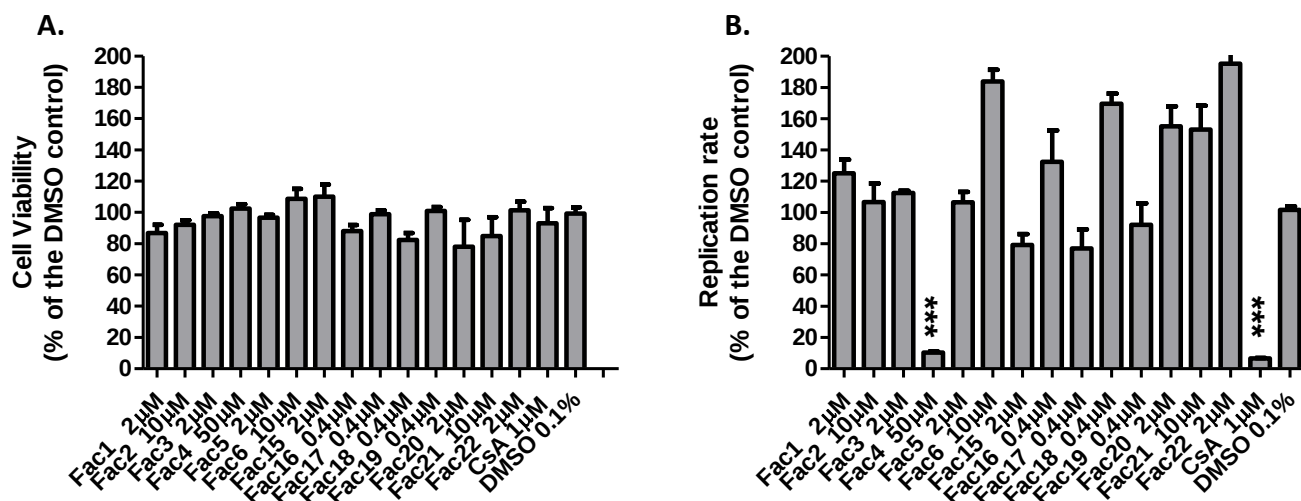
## **Conclusion**

Our results show that acridone Fac4 at non-toxic concentrations inhibited HCV genotype 2a replication *in vitro*. New approaches are in progress to understand its mode of action.

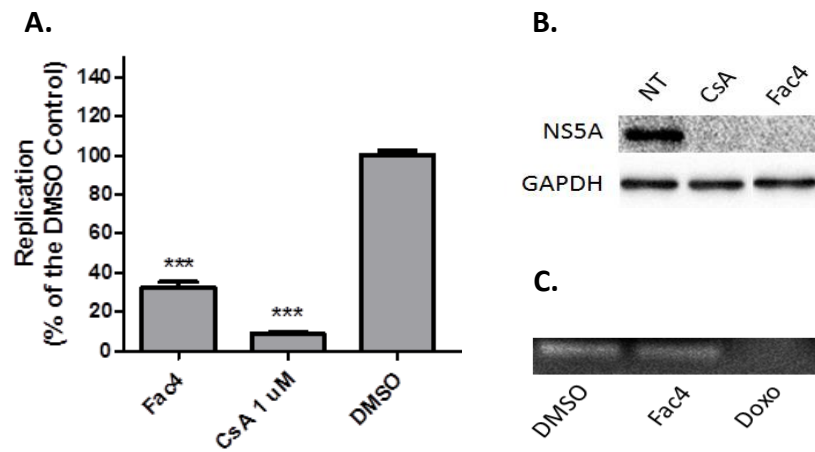
## Figures



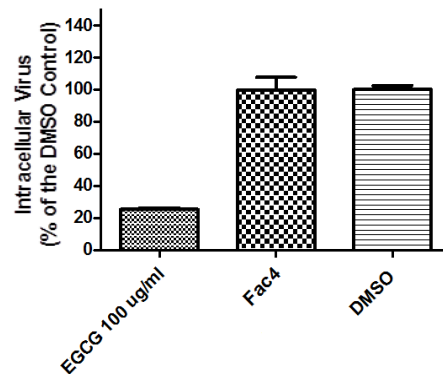
**Figure 1:** Subgenomic Replicon SGR-JFH1-FEO, which express the non-structural viral proteins and the phosphotransferase fusion protein luciferase-neomycin, and JFH-1 replicon, which express all viral proteins.



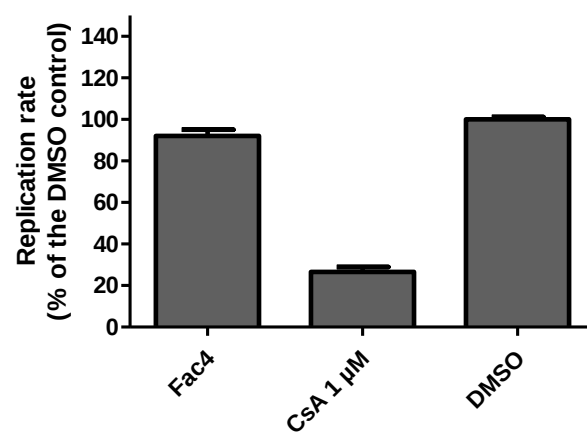
**Figure 2:** Initial screening of acridones. Both charts present the highest viable concentration of each compound. A) Cell viability by MTT assay; B) Replication measurement by Luciferase assay; The three asterisks represent a significant difference between control group and treated group at  $p < 0,001$ .



**Figure 3:** **A)** Replication assay in Huh 7.5 infected with JFH1 HCVcc. Cyclosporin (CsA) used as positive control. The three asterisks represent a significant difference between control group and treated group at  $p < 0,001$ . **B)** Western Blotting for NS5A viral protein detection. NT (Non-treated infected cells); CsA (Cyclosporin – positive control). **C)** Intercalation assay, evaluating Fac4 dsRNA intercalation property. Doxorubicin (Doxo) was used as positive control.



**Figure 4:** Entry assay in Huh 7.5 infected with JFH1 HCVcc. EGCG ((-)-epigallocatechin gallate) was used as positive control.



**Figure 5:** Replication assay in Huh 7.5 stably expressing genotype 3 subgenomic replicon S52/SG-Feo. Cyclosporin (CsA) used as positive control.

## References

- ADAMS, A. Crystal structures of acridines complexed with nucleic acids. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 18, p. 1667-75, Sep 2002. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171549> >.
- AHLQUIST, P. et al. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. **J Virol**, v. 77, n. 15, p. 8181-6, Aug 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857886> >.
- AKAHANE, Y. et al. Hepatitis C virus infection in spouses of patients with type C chronic liver disease. **Ann Intern Med**, v. 120, n. 9, p. 748-52, May 1 1994. ISSN 0003-4819 (Print) 0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147548> >.
- ALTER, H. J.; SEEFF, L. B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. **Semin Liver Dis**, v. 20, n. 1, p. 17-35, 2000. ISSN 0272-8087 (Print) 0272-8087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895429> >.
- APPEL, N. et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000035, Mar 2008. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18369481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18369481) >.
- ARAUJO E.S.A., S. O. S. **Hepatites na Cidade de Sao Paulo / Hepatitis in Sao Paulo City**. 2003. p.55-68
- ARGENTINI, C. et al. HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. **Future Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 359-73, Apr 2009. ISSN 1746-0921 (Electronic) 1746-0913 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327119> >.
- BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Nat Prod Rep**, v. 24, n. 6, p. 1225-44, Dec 2007. ISSN 0265-0568 (Print) 0265-0568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18033577> >.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriol Rev**, v. 35, n. 3, p. 235-41, Sep 1971. ISSN 0005-3678 (Print) 0005-3678 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4329869> >.
- BARTENSCHLAGER, R.; FRESE, M.; PIETSCHMANN, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. **Advances in Virus Research**, Vol. 63, v. 63, p. 71-+, 2004. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226026000002 >.
- BEHRENS, S. E.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 15, n. 1, p. 12-22, Jan 2 1996. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598194> >.

BITTAR, C. et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits DNA damage pathway by sequestering p53 to the cytoplasm. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62581, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638118> >.

BOSON, B. et al. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. e1002144, Jul 2011. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21814513> >.

BRASIL. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções**. SAÚDE, M. D. Brasília 2011.

\_\_\_\_\_. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfeções**. SAÚDE, M. D. Brasília 2015.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v. 25, n. 3, p. 475-516, Jun 2008. ISSN 0265-0568 (Print) 0265-0568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497896> >.

CENTO, V.; CHEVALIEZ, S.; PERNO, C. F. Resistance to direct-acting antiviral agents: clinical utility and significance. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 10, n. 5, p. 381-9, Sep 2015. ISSN 1746-6318 (Electronic) 1746-630X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26248125> >.

CHANDLER, D. E. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 9, p. e1002702, 2012. ISSN 1553-7358 (Electronic) 1553-734X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028296> >.

CHANG, R. S.; YEUNG, H. W. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. **Antiviral Res**, v. 9, n. 3, p. 163-75, Apr 1988. ISSN 0166-3542 (Print) 0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840849> >.

CHANSRINIYOM, C. et al. 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)**, v. 57, n. 11, p. 1246-50, Nov 2009. ISSN 1347-5223 (Electronic) 0009-2363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881276> >.

CHATEL-CHAIX, L.; BARTENSCHLAGER, R. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. **J Virol**, v. 88, n. 11, p. 5907-11, Jun 2014. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623440> >.

CHOWDHURY, J. B. et al. Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates IRF-7-Mediated Interferon-alpha Signaling. **J Interferon Cytokine Res**, v. 34, n. 1, p. 16-21, Jan 2014. ISSN 1557-7465 (Electronic) 1079-9907 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962002> >.

CRISTINA, J.; DEL PILAR MORENO, M.; MORATORIO, G. Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. **Virus Res**, v. 127, n. 2, p. 185-94, Aug 2007. ISSN 0168-1702 (Print)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449128> >.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2006. ISBN 978-1-4051-2509-3.

CRUZ-RIVERA, M. et al. Rapid hepatitis C virus divergence among chronically infected individuals. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 629-32, Feb 2013. ISSN 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224093> >.

DATE, T. et al. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 21, p. 22371-6, May 21 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990575> >.

DAVIS, G. L. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Am J Med**, v. 107, n. 6B, p. 21S-26S, Dec 27 1999. ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653451> >.

DAVIS, G. L. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med**, v. 339, n. 21, p. 1493-9, Nov 19 1998. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819447> >.

DE VEER, M. J. et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 912-20, Jun 2001. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404376> >.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. **Curr Pharm Des**, v. 7, n. 17, p. 1703-24, Nov 2001. ISSN 1381-6128 (Print) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562307> >.

DENNY, W. A. **Chemistry of antitumour agents**. Glasgow and London: Blackie and son ltd, 1990.

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 71-99, 2007. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067278> >.

EGGER, D. et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J Virol**, v. 76, n. 12, p. 5974-84, Jun 2002. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12021330](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12021330) >.

EL-BITAR, A. M. et al. Virocidal activity of Egyptian scorpion venoms against hepatitis C virus. **Virol J**, v. 12, p. 47, 2015. ISSN 1743-422X (Electronic)

1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889296> >.

ENOMOTO, N. et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. **J Clin Invest**, v. 96, n. 1, p. 224-30, Jul 1995. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542279> >.

ENOMOTO, N. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N Engl J Med**, v. 334, n. 2, p. 77-81, Jan 11 1996. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531962> >.

FLETCHER, N. F. et al. Hepatitis C virus infection of cholangiocarcinoma cell lines. **J Gen Virol**, v. 96, n. Pt 6, p. 1380-8, Jun 2015. ISSN 1465-2099 (Electronic) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701818> >.

FRIED, M. W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v. 347, n. 13, p. 975-82, Sep 26 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324553> >.

FUJIWARA, M. et al. Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells. **Antiviral Res**, v. 43, n. 3, p. 189-99, Oct 1999. ISSN 0166-3542 (Print) 0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551376> >.

GANE, E. J. et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. **N Engl J Med**, v. 368, n. 1, p. 34-44, Jan 3 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23281974> >.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 12, n. 3, p. 306-17, Jun 2008. ISSN 1367-5931 (Print) 1367-5931 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423384> >.

GAO, M. et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. **Nature**, v. 465, n. 7294, p. 96-100, May 6 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410884> >.

GENTILE, I. et al. MK-5172 : a second-generation protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 23, n. 5, p. 719-28, May 2014. ISSN 1744-7658 (Electronic) 1354-3784 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666106> >.

GERBER, L.; WELZEL, T. M.; ZEUZEM, S. New therapeutic strategies in HCV: polymerase inhibitors. **Liver Int**, v. 33 Suppl 1, p. 85-92, Feb 2013. ISSN 1478-3231 (Electronic) 1478-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23286851> >.

GHANY, M. G. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1433-44, Oct 2011. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21898493> >.

GONZALEZ-PERALTA, R. P. et al. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. **J Med Virol**, v. 49, n. 3, p. 242-7, Jul 1996. ISSN 0146-6615 (Print) 0146-6615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818972> >.

GOSERT, R. et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5487-92, May 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692249> >.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S45-57, Nov 2014. ISSN 1600-0641 (Electronic) 0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25086286> >.

GRIFFIN, S. D. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett**, v. 535, n. 1-3, p. 34-8, Jan 30 2003. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560074> >.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, Oct 2008. ISSN 1359-6446 (Print) 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691670> >.

HAYASHI, N. et al. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment-naïve hepatitis C genotype 1 patients in Japan: CONCERTO-1, a phase III trial. **J Hepatol**, v. 61, n. 2, p. 219-27, Aug 2014. ISSN 1600-0641 (Electronic) 0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727123> >.

HELLER, T. et al. An in vitro model of hepatitis C virion production. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 7, p. 2579-83, Feb 15 2005. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701697> >.

HONEGGER, J. R. et al. Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1529-33, Nov 2013. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162814> >.

HOOFNAGLE, J. H. et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. **N Engl J Med**, v. 315, n. 25, p. 1575-8, Dec 18 1986. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097544> >.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137-43, Jun 2003. ISSN 1045-1056 (Print) 1045-1056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770546> >.

HOUGHTON, M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. **J Hepatol**, v. 51, n. 5, p. 939-48, Nov 2009. ISSN 1600-0641 (Electronic) 0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781804> >.

ITOIGAWA, M. et al. Cancer chemopreventive activity of acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 193, n. 2, p. 133-8, Apr 25 2003. ISSN 0304-3835 (Print)  
0304-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706869> >.

JACOBSON, I. M. et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. **N Engl J Med**, v. 368, n. 20, p. 1867-77, May 16 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic)  
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607593> >.

JONES, C. T. et al. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **J Virol**, v. 81, n. 16, p. 8374-83, Aug 2007. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537845> >.

KANDA, T. et al. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. **J Virol**, v. 80, n. 9, p. 4633-9, May 2006. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611923> >.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta Med Okayama**, v. 55, n. 3, p. 133-59, Jun 2001. ISSN 0386-300X (Print)  
0386-300X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434427> >.

KATO, T. et al. Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. **J Virol**, v. 79, n. 1, p. 592-6, Jan 2005. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596851> >.

KATO, T. et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. **J Med Virol**, v. 64, n. 3, p. 334-9, Jul 2001. ISSN 0146-6615 (Print)  
0146-6615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424123> >.

KIM, S. et al. Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. **J Virol**, v. 85, n. 13, p. 6645-56, Jul 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)  
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525356> >.

KOHLI, A. et al. Treatment of hepatitis C: a systematic review. **JAMA**, v. 312, n. 6, p. 631-40, Aug 13 2014. ISSN 1538-3598 (Electronic)  
0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117132> >.

KOVALENKO, A. L. et al. [Intracellular localization of cycloferon, its binding with DNA and stimulation of cytokines expression after exposure to cycloferon]. **Tsitologiya**, v. 42, n. 7, p. 659-64, 2000. ISSN 0041-3771 (Print)  
0041-3771 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10994082> >.

KRAWCZYK, M. et al. Amidinoanthracyclines - a new group of potential anti-hepatitis C virus compounds. **Biol Chem**, v. 390, n. 4, p. 351-60, Apr 2009. ISSN 1431-6730 (Print)  
1431-6730 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19199832> >.

LAM, A. M. et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3359-68, Jun 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430955> >.

LAWITZ, E. et al. Sofosbuvir in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin for non-cirrhotic, treatment-naïve patients with genotypes 1, 2, and 3 hepatitis C infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 401-8, May 2013. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499158> >.

LAWITZ, E. et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 515-23, Feb 8 2014. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24209977> >.

LE GUILLOU-GUILLEMETTE, H. et al. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 17, p. 2416-26, May 7 2007. Disponível em:

< [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17552024](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17552024) >.

LEMON, S. M. et al. Hepatitis C virus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781760607 (alk. paper)  
0781760607 (alk. paper).

LI, H. C. et al. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7104-7122, Jun 21 2014. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000338519800003 >.

LI, Y. et al. The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 9, p. 544-58, Sep 2015. ISSN 1740-1534 (Electronic)  
1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256788> >.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933-8, Aug 18 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107832> >.

LOHMANN, V. et al. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. **J Virol**, v. 71, n. 11, p. 8416-28, Nov 1997. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343198> >.

LU, H. et al. Detection of hepatitis C virus RNA sequences in cholangiocarcinomas in Chinese and American patients. **Chin Med J (Engl)**, v. 113, n. 12, p. 1138-41, Dec 2000. ISSN 0366-6999 (Print)  
0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776153> >.

LU, L. G. et al. Inhibitory effect of oxymatrine on serum hepatitis B virus DNA in HBV transgenic mice. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 8, p. 1176-9, Apr 15 2004. ISSN 1007-9327 (Print)

1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069721> >.

LU, L. G. et al. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: a randomized double-blind and placebo-controlled multi-center trial. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 11, p. 2480-3, Nov 2003. ISSN 1007-9327 (Print)

1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14606080> >.

MA, Y. et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. **J Virol**, v. 85, n. 1, p. 86-97, Jan 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962101> >.

MACDONALD, A. et al. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 17775-84, May 16 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621033> >.

MANFRONI, G. et al. Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replication by acridone derivatives: identification of an NS3 helicase inhibitor. **J Med Chem**, v. 52, n. 10, p. 3354-65, May 28 2009. ISSN 1520-4804 (Electronic)

0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388645> >.

MANNS, M. P. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 958-65, Sep 22 2001. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583749> >.

MAO, Y. M. et al. Capsule oxymatrine in treatment of hepatic fibrosis due to chronic viral hepatitis: a randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter clinical study. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 22, p. 3269-73, Nov 15 2004. ISSN 1007-9327 (Print)

1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15484298> >.

MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol**, v. 66, n. 5, p. 3225-9, May 1992. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313927> >.

MATSUNAGA, H. et al. Isolation and structure of vanitaracin A, a novel anti-hepatitis B virus compound from *Talaromyces* sp. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 19, p. 4325-8, Oct 1 2015. ISSN 1464-3405 (Electronic)

0960-894X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26271586> >.

MAZZUCCO, M. B. et al. Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus. **J Biomed Sci**, v. 22, p. 29, 2015. ISSN 1423-0127 (Electronic)

1021-7770 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25908170> >.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-22, Jul 2007. ISSN 0031-9422 (Print)

0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574638> >.

MCHUTCHISON, J. G. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med**, v. 339, n. 21, p. 1485-92, Nov 19 1998. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819446> >.

MCPHEE, F. et al. Virological escape in HCV genotype-1-infected patients receiving daclatasvir plus ribavirin and peginterferon alfa-2a or alfa-2b. **Antivir Ther**, v. 19, n. 5, p. 479-90, 2014. ISSN 2040-2058 (Electronic) 1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24448487> >.

MIYAMOTO, M. et al. Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). **Intervirol**, v. 49, n. 1-2, p. 37-43, 2006. ISSN 0300-5526 (Print) 0300-5526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166787> >.

MIYANARI, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1089-U74, Sep 2007. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249256500017 >.

MIZOKAMI, M. et al. Interferon-alpha therapy exerts selective pressure on hepatitis C virus quasispecies equilibrium. **Antivir Ther**, v. 4, n. 1, p. 15-9, 1999. ISSN 1359-6535 (Print) 1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10682124> >.

MORIKAWA, K. et al. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. **J Viral Hepat**, v. 18, n. 5, p. 305-15, May 2011. ISSN 1365-2893 (Electronic) 1352-0504 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470343> >.

MULLER, V. D. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383618> >.

MUNIR, S. et al. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. **Virol J**, v. 7, p. 296, 2010. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040548> >.

MURPHY, D. et al. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatology**, v. 46, p. 623A, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-77, Mar 2007. ISSN 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309302> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, v. 17, n. 3, p. 215-34, Jun 2000. ISSN 0265-0568 (Print) 0265-0568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888010> >.

NIEPMANN, M. Hepatitis C virus RNA translation. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 369, p. 143-66, 2013. ISSN 0070-217X (Print)

0070-217X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463200> >.

OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. **Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application**. Springer Science & Business Media, 2009. 597 ISBN 0387854983, 9780387854984.

PAWLITSKY, J. M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 299, p. 261-84, 2006. ISSN 0070-217X (Print)  
0070-217X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568902> >.

PAWLITSKY, J. M.; CHEVALIER, S.; MCHUTCHISON, J. G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1979-1998, May 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246456400038 >.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5-19, Jan 2004. ISSN 0270-9139 (Print)  
0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14752815> >.

PERUMAL, V. et al. Hepatitis C and hepatitis B nucleic acids are present in intrahepatic cholangiocarcinomas from the United States. **Hum Pathol**, v. 37, n. 9, p. 1211-6, Sep 2006. ISSN 0046-8177 (Print)  
0046-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938527> >.

PICCININNI, S. et al. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 45670-9, Nov 22 2002. ISSN 0021-9258 (Print)  
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235135> >.

PLAZA, Z. et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. **Antivir Ther**, v. 17, n. 5, p. 921-6, 2012. ISSN 2040-2058 (Electronic)  
1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436385> >.

POPESCU, C. I. et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 2, p. e1001278, 2011. ISSN 1553-7374 (Electronic)  
1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347350> >.

POVEDA, E. et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. **Antiviral Res**, v. 108, p. 181-91, Aug 2014. ISSN 1872-9096 (Electronic)  
0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911972> >.

POYNARD, T. et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v. 352, n. 9138, p. 1426-32, Oct 31 1998. ISSN 0140-6736 (Print)  
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807989> >.

PRECIADO, M. V. et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 43, p. 15992-16013, Nov 21 2014. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473152> >.

RALPHS, S.; KHAN, S. A. The role of the hepatitis viruses in cholangiocarcinoma. **J Viral Hepat**, v. 20, n. 5, p. 297-305, May 2013. ISSN 1365-2893 (Electronic) 1352-0504 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565610> >.

RALSTON, R.; JACOBSON, I.; SCULL, M. The conundrum of relapse in STAT-C therapy: does HCV play the Red Queen or Rip Van Winkle? **Semin Liver Dis**, v. 31, n. 4, p. 410-9, Nov 2011. ISSN 1098-8971 (Electronic) 0272-8087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189980> >.

RAMIREZ-CARRETO, S. et al. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. **Peptides**, v. 73, p. 51-59, Sep 4 2015. ISSN 1873-5169 (Electronic) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352292> >.

RANEY, K. D. et al. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. **J Biol Chem**, v. 285, n. 30, p. 22725-31, Jul 23 2010. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457607> >.

RAYCHOUDHURI, A. et al. Hepatitis C virus infection impairs IRF-7 translocation and Alpha interferon synthesis in immortalized human hepatocytes. **J Virol**, v. 84, n. 21, p. 10991-8, Nov 2010. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810735> >.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, May 22 2008. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474274> >.

ROMEO, R.; RUMI, M.; COLOMBO, M. Alpha interferon treatment of chronic hepatitis C. **Biomed Pharmacother**, v. 49, n. 3, p. 111-5, 1995. ISSN 0753-3322 (Print) 0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647281> >.

ROSENQUIST, A. et al. Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. **J Med Chem**, v. 57, n. 5, p. 1673-93, Mar 13 2014. ISSN 1520-4804 (Electronic) 0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446688> >.

SAEED, M. et al. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 10, p. 5365-73, Oct 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869572> >.

SAKAI, A. et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11646-51, Sep 30 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504405> >.

SCHREGEL, V. et al. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5342-7, Mar 31 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282477> >.

SEEFF, L. B. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). **Liver Int**, v. 29 Suppl 1, p. 89-99, Jan 2009. ISSN 1478-3231 (Electronic)

1478-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207971> >.

SEPULVEDA, C. S. et al. Acridones as antiviral agents: synthesis, chemical and biological properties. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 2402-14, 2013. ISSN 1875-533X (Electronic)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521684> >.

SEPULVEDA, C. S. et al. Synthesis and evaluation of N-substituted acridones as antiviral agents against haemorrhagic fever viruses. **Antivir Chem Chemother**, v. 19, n. 1, p. 41-7, 2008. ISSN 0956-3202 (Print)

0956-3202 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18610557> >.

SHIRATORI, Y. et al. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. **Gastroenterology**, v. 113, n. 2, p. 558-66, Aug 1997. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247476> >.

SIMISTER, P. et al. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. **J Virol**, v. 83, n. 22, p. 11926-39, Nov 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740982> >.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962-73, Oct 2005. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16149085](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16149085) >.

SIMMONDS, P. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J Gen Virol**, v. 74 ( Pt 11), p. 2391-9, Nov 1993. ISSN 0022-1317 (Print)

0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245854> >.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 1006-15, Mar 30 2006. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412984> >.

STANKIEWICZ-DROGON, A. et al. Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibit subgenomic HCV replication. **J Med Chem**, v. 53, n. 8, p. 3117-26, Apr 22 2010. ISSN 1520-4804 (Electronic)

0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337460> >.

STANKIEWICZ-DROGON, A. et al. New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 19, p. 8846-52, Oct 1 2008. ISSN 1464-3391 (Electronic) 0968-0896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801660> >.

STEINMANN, E. et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e103, Jul 2007. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658949> >.

STORCH, E. et al. Production of interferon-beta by murine T-cell lines induced by 10-carboxymethyl-9-acridanone. **Scand J Immunol**, v. 23, n. 2, p. 195-9, Feb 1986. ISSN 0300-9475 (Print) 0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3081999> >.

SUMMA, V. et al. MK-5172, a selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4a protease with broad activity across genotypes and resistant variants. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 8, p. 4161-7, Aug 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22615282> >.

SUZUKI, T. et al. Hepatitis C viral life cycle. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 12, p. 1200-12, Oct 10 2007. ISSN 0169-409X (Print) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825945> >.

TABARRINI, O. et al. Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents. **J Med Chem**, v. 49, n. 8, p. 2621-7, Apr 20 2006. ISSN 0022-2623 (Print) 0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610805> >.

TABBA, H. D.; CHANG, R. S.; SMITH, K. M. Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. **Antiviral Res**, v. 11, n. 5-6, p. 263-73, Jun-Jul 1989. ISSN 0166-3542 (Print) 0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2802570> >.

TAKEMURA, Y. et al. Studies on the inhibitory effects of some acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation. **Planta Med**, v. 61, n. 4, p. 366-8, Aug 1995. ISSN 0032-0943 (Print) 0032-0943 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480187> >.

TANG, H.; GRISE, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 2, p. 49-65, Jul 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515018> >.

TELLINGHUISEN, T. L.; FOSS, K. L.; TREADAWAY, J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000032, Mar 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369478> >.

TOYODA, H. et al. Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon. **J Hepatol**, v. 26, n. 1, p. 6-13, Jan 1997. ISSN 0168-8278 (Print) 0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148023> >.

TURPIN, J. A. et al. Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 3, p. 487-94, Mar 1998. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9517921> >.

WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med**, v. 11, n. 7, p. 791-6, Jul 2005. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951748> >.

WANG, C.; SARNOW, P.; SIDDIQUI, A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. **J Virol**, v. 67, n. 6, p. 3338-44, Jun 1993. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388503> >.

WIELAND, S. et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2121-30, Jun 2014. ISSN 1527-3350 (Electronic)

0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122862> >.

WOZNIAK, A. L. et al. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 9, p. e1001087, 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824094> >.

WYLES, D. L. et al. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2660-2, Jun 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289518> >.

YAMAMOTO, N. et al. Anti-herpesvirus activity of citrussinine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. **Antiviral Res**, v. 12, n. 1, p. 21-36, Aug 1989. ISSN 0166-3542 (Print)

0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556960> >.

YAO, N. et al. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. **Structure**, v. 7, n. 11, p. 1353-63, Nov 15 1999. ISSN 0969-2126 (Print)

0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574797> >.

YAO, X. J.; WAINBERG, M. A.; PARNIAK, M. A. Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris*. **Virology**, v. 187, n. 1, p. 56-62, Mar 1992. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371029> >.

YIN, F.; CHEN, B. Detection of hepatitis C virus RNA sequences in hepatic portal cholangiocarcinoma tissue by reverse transcription polymerase chain reaction. **Chin Med J (Engl)**, v. 111, n. 12, p. 1068-70, Dec 1998. ISSN 0366-6999 (Print)

0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263365> >.

ZHONG, J. et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9294-9, Jun 28 2005. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939869> >.

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10 / 03 / 2016.

---

Assinatura do autor