ISABEL VELOSO ALVES PEREIRA

**Efeito do composto natural *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) no ciclo
de replicação do vírus da hepatite C (VHC)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira

São Paulo

2014

ISABEL VELOSO ALVES PEREIRA

**Efeito do composto natural *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) no ciclo
de replicação do vírus da hepatite C (VHC)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Isabel Veloso Alves

Efeito do composto natural *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) no ciclo de replicação
do vírus da hepatite C (VHC) / Isabel Veloso Alves Pereira. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira.

Descritores: 1.Hepatite C/efeito de drogas 2.Medicamentos de ervas chinesas
3.Técnicas de cultura de células 4.Reguladores do metabolismo de lipídeos
5.Hepacivirus 6.Replicação viral 7. Antivirais

USP/FM/DBD-350/14

AGRADECIMENTOS

Agradeço á minha orientadora Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira os anos de ensino, amor pela pesquisa e dedicação.

Agradeço aos Professores Heiner Wedemeyer, Sandra Ciesek e Thomas Von Hahn a ótima recepção, a possibilidade de ampliar meus conhecimentos em tecnologias de ponta e o desafio de estabelecer novas metodologias.

Agradeço ao pesquisador José Tadeu Stefano a parceria, amizade e divisão de conhecimentos.

Aos técnicos José Edson Pereira e Mariana torres.

A todos os colegas do laboratório Ciesek/Von Hahn por auxiliarem em minha formação.

À Faculdade de Medicina de Hannover Medizinische Hochschule Hannover por me receber nos estágios no exterior.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) e ao Programa Ciências sem Fronteiras (CAPES/CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Fundação Alves de Queiroz pela doação do YHK.

À minha família e aos amigos pelo apoio incondicional, afeto e desejo de que minhas realizações sejam alcançadas.

A ciência pode classificar e nomear os órgãos de um sabiá

Mas não pode medir seus encantos.

A ciência não pode calcular quantos cavalos de força

Existem

Nos encantos de um sabiá.

Quem acumula muita informação perde o condão de adivinhar:

divinare.

Os sabiás divinam.

Manoel de Barros

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O vírus da hepatite C.....	3
1.1.1 Ciclo de replicação	5
1.2 Ciclo de replicação do VHC e lipídios.....	11
1.3 Yo Jyo Hen Shi Ko	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Local	17
3.2 Reagentes	17
3.3 Cultura Celular	18
3.4 Constructos.....	18
3.5 Preparação dos plasmídeos.....	19
3.5.1 Transformação de bactérias.....	19
3.5.2 Preparação de plasmídeos- Midiprep	20
3.5.3 Preparação de plasmídeos- Maxiprep.....	21
3.5 Transcrição <i>in vitro</i> (JC1-Fluc, JFH1-NS35B e recombinantes).....	22
3.5.1 Linearização.....	22
3.5.2 Extração do DNA.....	22
3.5.3 Transcrição <i>in vitro</i>	23
3.5.4 Extração do RNA	24
3.6 Ensaio de Citotoxicidade	24
3.7 Preparação de pseudo-partículas retrovirais (VHCpp - Entrada).....	25
3.8 Ensaio de Replicação Viral / Produção de partículas infectantes.....	26
3.9 Ensaio de infecção do VHC.....	26
3.10 Ensaio de dose infecciosa das culturas de tecidos a 50 % (50 % <i>Tissue Culture Infective Dose</i> -TCID50)	27

3.11 Imunohistoquímica – NS5A	27
3.12 Ensaio de Luciferase	28
3.13 Biossegurança	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Ensaio de citotoxicidade.....	29
4.2 Entrada do vírus (VHCpp)	30
4.3 Replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B	31
4.4 Con1-NS5	32
4.5 JC1-Fluc – replicação e liberação de novas partículas virais.....	33
4.6 Infecção de diferentes genótipos do VHC na presença de YHK.....	34
6. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência global do vírus da hepatite C e distribuição dos genótipos no Brasil.....	1
Figura 2. Organização genômica do vírus C.....	4
Figura 3. Ciclo de Replicação do VHC: entrada, perda do envelope, tradução/replicação do RNA, montagem e liberação de novas partículas infectantes.	6
Figura 4. Entrada do VHC na célula- interação com os receptores e internalização do vírus.....	8
Figura 5. Montagem e Liberação de novas partículas virais. a) Recrutamento do RNA pelo complexo de replicação, transporte da proteína do Core mediada por DGAT1 e união p7-NS2. b) Transporte do RNA para a montagem, interação de p7-NS2 com NS3-4A, formação do novo nucleocapsídeo. c) Maturação do VHC é similar à formação de VLDL.	11
Figura 6. O papel do VHC na esteatose. A infecção pelo VHC provoca a ativação de mecanismos da lipogênese e a diminuição na síntese e exportação de lipídeos, provocando o aumento de lipídios nos hepatócitos.	13
Figura 7. Modelo das alterações promovidas pelo VHC em esteatohepatite experimental.....	15
Figura 8. A figura representa a construção da poliproteína do plasmídeo JC1; as partes em negrito representam a formação quimérica do segmento J6/CF. Abaixo a poliproteína do vírus do genótipo 2a da linhagem do vírus de hepatite fulminante japonês JFH1.....	19
Figura 9. Ensaio de Citotoxicidade dos compostos. Os gráficos indicam a medida de luciferase após 48h de incubação com as diferentes concentrações dos compostos. Uma linhagem celular de Huh7.5 que expressa o gene repórter que codifica <i>firefly luciferase</i> (Huh7.5-VSV-Fluc), foi utilizada para o ensaio. Os gráficos demonstram ausência de toxicidade nas concentrações utilizadas.	29
Figura 10. Ensaio de Pseudo partículas- VHCpp. VHCpp foram geradas através da co-transfecção de três plasmídeos em células 293T: gag-pol genes do HIV, um genoma do retrovírus contendo apenas a parte terminal, um gene repórter e o sinal de empacotamento e as proteínas de interesse. As pseudopartículas carregavam as glicoproteínas do envelope do VHC E1/E2, ou um vetor vazio (controle negativo), ou ainda as proteínas do vírus da	

estomatite vesicular (controle positivo). Não houve diferenças na entrada do vírus na célula na presença dos compostos. 30

Figura 11. Ensaio de Citotoxicidade dos compostos e replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B. Os gráficos indicam a ausência de toxicidade nas concentrações utilizadas, bem como ausência de diferenças na replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B na presença do YHK ou dos compostos. O subgenoma foi eletroporado em células Huh7.5 e após o período de incubação com os compostos a cultura foi lisada e utilizada para medição de luciferase. Os resultados são apresentados pela média da quantificação de luciferase em cada amostra (unidade relativa de luciferase URL/ poço). 31

Figura 12. Ensaio de replicação do subgenoma Con1 em células HuH7.5. Os compostos Pinoresinol e Notoginsenoside-R1 apresentaram efeito moderado diminuindo a replicação de Con1. Os resultados são apresentados pela média da quantificação de luciferase em cada amostra (unidade relativa de luciferase URL/ poço). 32

Figura 13. Gráficos representando a replicação e infecção do JC1-Fluc em células Huh7.5. A linha azul representa o ensaio de replicação do genoma viral após eletroporação do RNA viral e a vermelha representa a infecção de novas células com o sobrenadante das células eletroporadas. Os resultados são apresentados pela média da quantificação de luciferase em cada amostra (unidade relativa de luciferase URL / poço). 33

Figura 14. O gráfico representa o título do VHC após a infecção dos diferentes genótipos na presença de diferentes concentrações de YHK. A infecção foi detectada pela presença da proteína NS5A por imunohistoquímica. A TCDI50 foi calculada pelo método de Reed e Münch. 34

LISTA DE ABREVIações

AADs –	Agentes antivirais diretos
ADFP –	Adipofilina
Amp –	Ampicilina
BSA –	Albumina de soro bovino
CAPPesq –	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CD81 –	<i>Cluster of differentiation 81</i>
CLDN1 –	Claudina 1
cLDs –	<i>Cytosolic lipid droplets</i>
CPT1A –	<i>Carnitine palmitoyl acyl-coa transferase 1a</i>
DGAT1 –	Diacilglicerol o-aciltransferase
DMEM –	Meio Dulbecco´s modificado
FASn –	<i>Fatty acid synthase</i>
FMUSP –	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GaGs –	Glicosaminoglicanas
IRES –	<i>Internal ribossomal entry site</i>
ISDR –	Região determinante da sensibilidade ao interferon
LB –	Meio de cultura Lúria-Bertani
LDL-R –	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
LDs –	<i>Lipid droplets</i>
LP –	Lipoproteínas
MTP –	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>

NPC1L1 –	Niemann Pick C1 like 1
NTR1 –	Notoginsenoside R1
OCLN –	Ocludina
<i>ORF</i> –	<i>Open reading frame</i>
PBS –	Tampão fosfato-salino
PEI –	<i>Polietilenoimina</i>
PPAR α –	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor α</i>
RE –	Retículo endoplasmático
RNA –	Ácido ribonucleico
SCD-1 –	<i>Stearoyl-coa desaturase-1</i>
SR-BI –	<i>Scavenger receptor class b type 1</i>
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element binding protein 1</i>
SREBP-2 –	<i>Sterol regulatory element binding protein 2</i>
TCID ₅₀ –	<i>50 % Tissue culture infective dose</i>
TRF1 –	Receptor de transferrina
UTR/ NTR –	<i>Untranslated regions</i>
VHC –	Vírus da hepatite C
VLDL –	<i>Very low density lipoprotein</i>
YHK –	<i>Yo Jyo Hen Shi Ko</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

µg – micrograma

µL– microlitro

g – unidade de aceleração gravitacional

h – hora

min – minuto/minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

°C– grau Celsius

rpm – rotações por minuto

s - segundos

UI – unidade internacional

v – volts

RESUMO

Estima-se que 170 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o vírus da hepatite C (VHC), o que está altamente relacionado à ocorrência de hepatite crônica e carcinoma hepatocelular. A prevalência de esteatose hepática em doentes com hepatite C crônica é muito maior do que na população geral variando entre 40 a 75%. A associação entre a infecção pelo VHC e esteatose hepática é multifatorial. Duas formas de esteatose hepática são encontradas em pacientes com hepatite C crônica: esteatose metabólica (fatores de risco) e citopática relacionada ao genótipo 3a. Os lipídios são essenciais para o ciclo de replicação do VHC, eles podem exercer seu efeito em diferentes níveis como: grupos prostéticos em proteínas virais e/ou cofatores celulares na replicação de VHC, componentes especializados na estrutura do VHC onde ocorre a replicação ou como constituinte das partículas lipovirais. Trabalhos experimentais realizados anteriormente por nosso grupo relataram que a administração do composto natural *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) promove a inibição do desenvolvimento da esteatose, redução dos marcadores de estresse oxidativo, menor escore de inflamação, melhora nas concentrações de aminotransferases e diminuição da gordura visceral em um modelo animal de esteato-hepatite não alcoólica. A terapia padrão da hepatite C consiste em uma combinação de interferon peguilado alfa (PEG-IFN- α) que estimula o sistema imunológico do hospedeiro para combater a infecção e o composto antiviral ribavirina. Atualmente foram aprovados pelas agências de saúde os inibidores de protease

Boceprevir, Telaprevir, Daclatasvir e Simeprevir. No entanto, sua eficiência varia entre os genótipos e as constantes mutações do vírus podem levar a resistência. A falta de uma vacina ou uma terapia definitiva faz com que diversos compostos com diferentes mecanismos de ação sejam testados como possíveis alternativas de tratamento. Tendo em vista a capacidade do YHK de reduzir a esteatose e a importância do metabolismo para a replicação do VHC, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do YHK no ciclo celular do VHC. Para isso foram utilizadas técnicas de cultura celular que permitem o estudo das diferenças fases do ciclo de replicação do VHC: entrada (VHCpp), replicação – replicons JFH1-NS3-5B e Con1, replicação e infecção- JC1-Fluc. De forma a elucidar a possibilidade de um único componente da fórmula YHK apresentar efeito sobre o VHC, foram utilizadas para comparação as substâncias ativas de seus ingredientes isoladamente: *Panax pseudo ginseng* - Notoginsenoside R1; *Eucommia ulmoides* -(±) Pinoresinol; Licorice root - Ácido Glicirrizínico. Os compostos não apresentaram efeitos na entrada, replicação e liberação de novas partículas virais. Devido à ausência de resultados bem delineados e tendo em vista os resultados das terapias anti-VHC atuais e futuras, é improvável que compostos naturais sejam utilizados ou chegarão ao desenvolvimento clínico nesta indicação.

ABSTRACT

Worldwide is estimated that nearly 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV), highly correlated with the occurrence of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. Hepatitis C patients present higher prevalence of steatosis when compared with the general population, ranging between 40% and 75%. There are two forms of steatosis in HCV infected patients: metabolic steatosis (risk factors) and cytopathic associated with genotype 3. Lipids are essential for the HCV replication cycle. It acts on different functions: as prosthetic groups into viral proteins and / or cellular cofactors in the HCV replication, as specific HCV components or as a constituent of lipovirals particles. Our group previously reported that the administration of the natural compound *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) inhibits steatosis development, decreases markers of oxidative stress and inflammation, improves aminotransferases concentration and decreases the visceral fat. Standard therapy for hepatitis C is a combination of pegylated interferon alpha (PEG-IFN- α), stimulating the host immune system to fight infection and the antiviral compound named ribavirin. Nowadays, Telaprevir, Boceprevir, Sofosbuvir and Simeprevir are approved as new anti-HCV drugs; they act as protease inhibitors. Its efficiency, however, varies between genotypes, and the constant mutations of the virus can lead to resistance. The lack of vaccines, or a definitive therapy, stimulates the research of new compounds and alternative treatments. In this study, we evaluated the effect of YHK in HCV replication

cycle due to the effect of YHK and the importance of lipid metabolism for HCV. For this purpose we used cell culture techniques allowing the study of different stages of HCV replication cycle: entry (HCVpp), replication – replicons JFH1 NS3-5B and Con1, also replication and infection-JC1-Fluc. We also used active compounds of its ingredients: Panax pseudo ginseng – Notoginsenoside R1; eucommia - ($\pm$) pinoresinol, Licorice root – Glycyrrhizinic Acid in order to elucidate a possible effect of a single component of the YHK formula in HCV. We could not observe any difference in HCV entry, replication and release in the presence of the four compounds. It is unlikely that natural compounds will be used or come to clinical development in this indication, due to the absence of well defined results and in view of the results of new anti-HCV therapies.

1. INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença com impacto global, estima-se que 170 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o vírus da hepatite C (VHC) e sua distribuição apresenta diferenças regionais (Figura 1) (1). No Brasil, entre 2 a 5% da população está infectada com o VHC. Em São Paulo, a incidência é de aproximadamente 2% (2).

Figura 1. Prevalência global do vírus da hepatite C e distribuição dos genótipos no Brasil.

Figura modificada: *Center for disease analysis*, 2012.

A transmissão do VHC ocorre normalmente por via sanguínea sendo a utilização de drogas intravenosas e a transfusão sanguínea as formas mais comuns de infecção. Esta última vem se tornando cada vez mais rara já que os bancos de sangue incluíram em sua rotina os testes para detectar a presença do VHC. Outra forma de transmissão da hepatite C é por via sexual. Alguns fatores podem aumentar o risco de infecção: grande número de parceiros sexuais, história de doença sexualmente transmissível e a falta de uso de preservativo (3). Frequentemente não é possível estabelecer um fator de risco em pacientes portadores do VHC.

A hepatite C pode se manifestar de forma aguda ou crônica. A doença aguda é relativamente rara se levarmos em conta a disseminação do vírus. Durante a forma aguda a elevação dos níveis séricos de aminotransferases ocorre entre 6 a 12 semanas após a infecção, podendo ainda apresentar-se mais tardiamente. Na maioria dos pacientes agudos, a hepatite é assintomática ou se apresenta de forma leve. Os sintomas incluem mal-estar, náusea e dor abdominal no quadrante superior direito (4).

A doença é considerada crônica a partir de seis meses de persistência dos níveis elevados de aminotransferases e é a forma mais comum, 75% dos pacientes com a forma aguda ainda apresentam o RNA viral no sangue e podem progredir com a doença. Os pacientes crônicos são também, em geral, assintomáticos ou têm sintomas leves e não específicos desde que não apresentem cirrose. A hepatite C crônica está intimamente relacionada à ocorrência de carcinoma hepatocelular e conseqüentemente é uma das principais causas de transplante hepático (5-7).

Embora sua história natural seja conhecida com a progressão da doença para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, os fatores que determinam esse curso ainda são controversos. Algumas características relacionadas ao hospedeiro parecem determinar a rapidez e a gravidade da doença como: idade, gênero, etnia, resposta imune, consumo de álcool, uso de maconha, coinfeção viral e o uso de esteroides (8).

O risco de um paciente desenvolver cirrose em 20 anos de doença é de aproximadamente 20% e por volta de 30% dos pacientes não apresentarão cirrose por pelo menos 50 anos. As complicações da doença ocorrem exclusivamente em pacientes cirróticos. O risco de doença descompensada é estimado em 5% ao ano em cirróticos. Uma vez descompensados a taxa de sobrevivência em 5 anos é de aproximadamente 50% (9).

1.1 O vírus da hepatite C

O VHC é um pequeno vírus envelopado e possui um ácido ribonucleico (RNA) de fita simples positiva de 9,6kb e 50nm. O VHC faz parte do gênero *Hepacivirus* e da família *Flaviviridae* (10). Sua cadeia de RNA consiste em duas regiões não traduzidas (*Untranslated regions* – UTRs) 3' e 5' e uma fase aberta de leitura (*Open reading frame* - ORF) que codifica uma proteína precursora com aproximadamente 3000 aminoácidos. Na região 5'UTR (NTR) encontra-se o sítio interno de entrada do ribossomo (*Internal ribosomal entry site* – IRES) responsável pela tradução do RNA. Esta proteína precursora é clivada em quatro partes estruturais na região N-terminal: a proteína do

nucleocapsídeo (Core), duas proteínas que codificam o envelope (E1 e E2) e p7. A região C-terminal por sua vez é clivada em seis proteínas não estruturais, NS2, NS3, NS4 (NS4A, NS4B) e NS5 (NS5A e NS5B) (11, 12) (figura 2).

Figura 2. Organização genômica do vírus C.

Figura adaptada. Fonte: Arquivo pessoal Sandra Ciesek.

Embora todas as funções das proteínas não estejam totalmente elucidadas muitas já são conhecidas. A proteína do Core é responsável pela formação do capsídeo viral e possui funções regulatórias na tradução e replicação do RNA, sendo também sinalizadora da montagem da partícula viral. As glicoproteínas E1 e E2, além de formarem o envelope viral, são mediadoras da endocitose. A proteína p7 forma um canal iônico no retículo endoplasmático (RE) e é essencial para formação dos vírions (vírus infectantes).

As proteínas não estruturais NS2 e NS3 são duas proteases com atividade ATPase/helicase e clivam a poliproteína entre essas regiões. A NS4A é um cofator desta protease, já a NS4B possui papel fundamental na replicação viral por formar uma rede membranosa no RE durante este processo. A NS5A é uma fosfoproteína que contém a região determinante da sensibilidade ao

interferon (ISDR) importante para a resposta da terapia com interferon alfa. Já a NS5B é uma RNA polimerase responsável pela replicação viral (13-17).

O VHC apresenta ampla heterogeneidade genética, devido à diversidade de sequências do vírus ele pode ser dividido em sete genótipos diferentes (1-7), que diferem entre si por cerca de 30-33% de nucleotídeos (18, 19), e seus subsequentes subtipos (a, b, c, etc.). Dentro de um mesmo genótipo ou subtipo pode ainda haver variações, causadas pela replicação imperfeita do vírus, em decorrência da baixa “fidelidade” da enzima RNA-replicase, que não possui atividade corretiva, aparecendo assim, pequenas e constantes mutações.

O genótipo mais comum entre populações caucasianas é o 1 (20, 21). Os genótipos 1, 2 e 3 são distribuídos no mundo inteiro, os genótipos 4 e 5 são mais prevalentes na África e o genótipo 6 é encontrado principalmente na Ásia (1). O genótipo 7 provavelmente provém da África Central (22) (Figura 1).

1.1.1 Ciclo de replicação

O ciclo de replicação do VHC é um mecanismo complexo que envolve uma grande quantidade de fatores e proteínas virais, bem como do hospedeiro. O ciclo pode ser dividido nas seguintes fases: entrada, replicação do RNA, montagem e liberação de novas partículas virais (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de Replicação do VHC: entrada, perda do envelope, tradução/replicação do RNA, montagem e liberação de novas partículas infectantes.

Figura adaptada Popescu e colaboradores, 2010 (23).

1.1.1.1 Entrada do vírus na célula

A entrada do VHC na célula é mediada por uma cascata de interações de proteínas celulares e proteínas do envelope viral (E1 e E2). As glicoproteínas do envelope participam de todos os processos de entrada do vírion: ligação com a célula, endocitose e fusão em pH ácido nos endossomos.

As proteínas celulares envolvidas no processo de entrada do VHC já descritas são: as glicosaminoglicanas (GaGs), o receptor de lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein receptor*-LDL-R), o receptor CD81

(*cluster of differentiation 81*) e principalmente o SR-B1 (*scavenger receptor class b type 1*). Além das proteínas de junção celular claudina 1 (CLDN1) e ocludina (OCLN) (figura 4).

O VHC circula pelo sangue coberto por lipoproteínas (LP) e ao entrar em contato com a membrana basolateral dos hepatócitos é internalizado por endocitose mediada por clatrin. Acredita-se que inicialmente a partícula viral se acopla as GaGs e ao LDL-R, sendo a ligação ao LDL-R dispensável, porém importante para otimização da replicação viral (24).

Em seguida o VHC se liga ao SR-B1, esta interação contribui inicialmente para a fixação do vírion devido à sua ligação com as lipoproteínas. A capacidade de transferência de lipídeos do SR-B1 é importante para eventos pós-ligação e maior eficácia na entrada do vírus. Por final esta interação muda a conformação do vírus permitindo a ligação de E2 ao CD81 (25).

Posteriormente, uma porção de sinalizadores para recrutamento de CLDN1 é emitida pela célula. A CLDN1 se liga então ao CD81 e interage com OCLN promovendo a internalização da partícula viral (26, 27). Algumas interações não virais podem influenciar a entrada do vírus. Entre elas as que alteram a absorção de lipídeos e colesterol como, por exemplo, o receptor de colesterol Niemann Pick C1 like 1 (NPC1L1), cuja inibição demonstra *in vitro* inibição da entrada do VHC (28).

Além disso, observações clínicas em pacientes com hepatite C demonstraram o constante acúmulo de ferro no fígado. Recentemente, um estudo mostrou que o receptor da transferrina (TRF1) também age como um receptor celular de entrada embora sua função não esteja esclarecida (29).

Figura 4. Entrada do VHC na célula- interação com os receptores e internalização do vírus.

Fonte: Modificado de Wong-Staal e colaboradores, 2010 (30).

1.1.1.2 Replicação viral

Após a internalização, o envelope é liberado no citoplasma e o RNA é utilizado para tradução e replicação no citoplasma. Por se tratar de um RNA positivo este age como um RNA mensageiro e será diretamente traduzido. Como dito anteriormente, a presença da IRES permite que o RNA seja acoplado ao ribossomo e inicia-se então a tradução do RNA viral que ocorre no interior do RE (31). A tradução da origem a poliproteína que será clivada em dez produtos diferentes.

O VHC, como outros vírus de RNA positivo, promove alterações na membrana citoplasmática sinalizadas pela ação da NS4B em conjunto com NS5A, denominadas rede membranosa. Esta rede contém membranas do RE e

dos adipossomos (*lipid droplets* - LDs). Sendo utilizada como sítio da NS5B (RNA replicase) que replica o RNA positivo formando uma fita negativa. Os RNAs sintetizados são utilizados para tradução, ou seja, produção de novas proteínas virais, para a replicação de novos RNAs e para formação de novas partículas virais (32).

1.1.1.3 Montagem e Exportação das partículas virais

Os últimos passos do ciclo de replicação são: a montagem e a liberação dos vírions. Após a síntese das proteínas e do RNA do VHC, novas partículas virais são formadas no RE. Durante o trânsito pelo mecanismo de secreção celular, estas partículas são maturadas e adquirem menor densidade antes de serem exocitadas.

Devido à localização citosólica da proteína do Core, a montagem parece ocorrer em duas etapas: inicialmente no lado citosólico da membrana do RE e depois uma fase de maturação interna. Dois modelos são propostos: no primeiro, a proteína do Core é transferida para a superfície das gotículas lipídicas citosólicas (*cytosolic lipid droplets* - cLDs) e é recrutada pela membrana do RE onde interage com NS5A. Neste caso as cLDs servem como veículo de transporte transferindo a proteína do Core para sítios de montagem. No segundo modelo, a formação do nucleocapsídeo inicia-se na superfície das cLDs e a liberação do RNA viral é mediada pela NS5A (33). O tráfico da proteína do Core para as cLDs envolve a enzima diacilglicerol O-aciltransferase (DGAT1), esta enzima sintetiza os triglicerídeos estocados nas cLDs.

As proteínas não estruturais são essenciais para a montagem dos vírions, porém elas não são empacotadas. O primeiro passo envolve a interação da NS5A com a cLD ligada a proteína do Core (Core-cLD), sendo este processo intensificado pela DGAT1. Adicionalmente, NS2 liga-se com p7 o que promove o deslocamento da Core-cLD para os sítios de montagem do vírion. O complexo p7-NS2 interage com NS3-4A sendo esta reação a de maior importância para a transformação da Core-cLD em novas partículas virais (25).

As complexas modificações nas proteínas E1 e E2 evidenciam a passagem dos vírions pelo complexo de Golgi, bem como a mudança de densidade, processo parecido com a produção de partículas lipídicas de baixa densidade (*very low density lipoprotein* - VLDL). Durante esse processo a p7 é responsável pela manutenção do pH do mecanismo secretório. Por fim, foi observado que o VHC pode infectar novas células sem a detecção de partículas virais, o processo conhecido como transmissão célula-célula ainda não está elucidado (34).

Figura 5. Montagem e Liberação de novas partículas virais. a) Recrutamento do RNA pelo complexo de replicação, transporte da proteína do Core mediada por DGAT1 e união p7-NS2. b) Transporte do RNA para a montagem, interação de p7-NS2 com NS3-4A, formação do novo nucleocapsídeo. c) Maturação do VHC é similar à formação de VLDL.

Fonte: Adaptado de Lindenbach e colaboradores 2013 (25).

1.2 Ciclo de replicação do VHC e lipídios

A infecção pelo VHC é associada ao aumento da lipogênese, redução da secreção de lipídeos, bem como aumento da β -oxidação (figura 6). Os lipídios são essenciais para todas as fases do ciclo de replicação do VHC (35).

In vitro, o VHC induz a ativação transcricional, processamento proteolítico e fosforilação de dois fatores SREBP-1c e SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein 1-2*), responsável pela transativação de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e colesterol. Foi observado que o 25-hidroxicolesterol, um inibidor da clivagem/translocação SREBP, promove uma diminuição na biossíntese de ácidos graxos e replicação do VHC. Em contraste, a nistatina, que ativa o precursor de SREBP através do sequestro de colesterol, causou um aumento dose-dependente nos níveis de replicação por quase 100%. A regulação da síntese de novo de ácidos graxos e colesterol é importante para aumentar a disponibilidade de constituintes lipídicos necessários para uma eficiente replicação do VHC (36).

O VHC pode também diminuir a exportação do colesterol e aumentar o estresse oxidativo via disfunção mitocondrial levando a esteatose hepática (37). Pacientes com hepatite C que apresentam esteatose possuem um reduzido nível de PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*) e CPT1A (*carnitine palmitoyl acyl-coa transferase 1a*) sugerindo um aumento da β -oxidação associada ao VHC (38).

Além disso, o VHC como elucidado anteriormente utiliza os receptores lipídicos SR-B1 e LDL-R e compartilha a mesma rota de secreção e maturação do VLDL.

Figura 6. O papel do VHC na esteatose. A infecção pelo VHC provoca a ativação de mecanismos da lipogênese e a diminuição na síntese e exportação de lipídeos, provocando o aumento de lipídios nos hepatócitos.

Fonte: Adaptado de Syed e colaboradores, 2010 (39).

Por fim, é importante ressaltar que a esteatose está diretamente relacionada com a infecção pelo genótipo 3 do VHC, entretanto, na infecção por outros genótipos ela está relacionada a síndrome metabólica. A esteatose ocorre em 73% dos pacientes infectados com genótipo 3 enquanto em pacientes com outros genótipos virais sua incidência é de 50%.

1.3 Yo Jyo Hen Shi Ko

O composto natural denominado *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) (Kyotsujigyo Inc., Japão) é utilizado na medicina chinesa há muitos anos, sendo derivado do *Henshiko* e composto por 4 ingredientes: *Panax pseudo ginseng*, *Eucommia ulmoides*, *Polygonati rhizoma* e *Raiz de Licorice* (40). Seus compostos apresentam propriedades farmacêuticas e são utilizados no tratamento de várias doenças hepáticas. O *Panax ginseng* foi descrito como composto hipoglicemiante e antioxidante, assim como a *Eucommia* que também apresenta efeitos antiinflamatórios. Já o *Polygonati* e a *Licorice* são conhecidos antioxidantes (41, 42).

Em humanos o YHK administrado por 3 meses reduziu o nível das aminotransferases e não apresentou efeitos adversos (43). Estudos realizados anteriormente por nosso grupo com esteato-hepatite experimental relataram a inibição do desenvolvimento da esteatose, redução dos marcadores de estresse oxidativo, menor escore de inflamação, melhora nas concentrações de aminotransferases, diminuição da gordura visceral. Identificou-se um aumento da expressão do gene MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) e PPAR α bem como uma redução na expressão do PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) no mesmo modelo animal (44, 45).

Também foi observado que o YHK promove a redução da esteatose modulando a expressão de genes relacionados à síntese *de novo* como SREBP e da FASn (*fatty acid synthase*), e em contrapartida, aumenta a expressão da MTP e da SCD-1 (*stearoyl-coa desaturase-1*) ocasionando uma

maior exportação de triglicerídeos. Bem como modula as proteínas de LD: Perilipina e ADFP (adipofilina) (figura 7) (46).

Figura 7. Modelo das alterações promovidas pelo YHK em esteatohepatite experimental.

Fonte: Pereira e colaboradores, 2013 (46).

Tendo em vista a atividade do YHK no metabolismo lipídico e sua importância para a replicação do VHC o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do YHK no ciclo de replicação celular do VHC

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a ação do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) sobre o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em cultura celular: entrada, replicação e infecção.
2. Comparar o efeito da fórmula YHK com as substâncias ativas de seus ingredientes:
 - Panax pseudo ginseng - Notoginsenoside R1.
 - Eucommia ulmoides $-(\pm)$ Pinoresinol.
 - Licorice root - Ácido Glicirrizínico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi realizado no Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Hannover (Medizinische Hochschule Hannover) e, no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP - LIM/07). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da FMUSP, sob protocolo de pesquisa nº 292/12.

3.2 Reagentes

O composto natural denominado *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) (Kyotsujigyo Inc. Japão) (<http://www.chashi.info/en>) foi gentilmente cedido pela Fundação Alves de Queiroz. Este composto foi comparado com substâncias ativas de cada um de seus ingredientes: *Panax pseudo ginseng* - Notoginsenoside R1 (LKT Laboratories, Inc. St. Paul); *Eucommia ulmoides* - ($\pm$) Pinoresinol (Sigma Aldrich); Raiz de Licorice - Ácido Glicirrizínico (Glycyrrhizic Acid, LKT Laboratories, Inc. St. Paul). Os compostos YHK e ácido glicirrizínico foram dissolvidos em água para injeção, já o Notoginsenoside R1 e o Pinoresinol foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO).

3.3 Cultura Celular

As linhagem celulares Huh7.5 e 293T foram cultivadas em meio Dulbecco's modificado (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) com 10% de soro fetal bovino, 1x aminoácidos não essenciais (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), 100 µg/ mL de estreptomicina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e 100 UI/ mL de penicilina (Invitrogen). As passagens das células foram feitas a cada dois dias para a linhagem 293T e a cada três dias para a linhagem Huh7.5. Em todos os experimentos foram utilizadas células abaixo de 50 passagens.

3.4 Constructos

Foram utilizados para os diversos ensaios os seguintes constructos: JFH1 NS3-5B (subgenômico); JC1-Fluc (genoma completo)- genótipo 2a; Con1 NS5 – genótipo 1b, bem como um sistema recombinante de JFH1 para os diferentes genótipos (1a, 1b, 2b, 3a, 4a, 5a, 6a) do VHC (47). Além de os plasmídeos utilizados para o ensaio de pseudo-partículas HIV-gag-pol; CSFluc; PcDNA3.0; H77 e VSVG.

O genoma do vírus repórter JC1-Fluc (Figura 6) representa uma quimera intragenômica do VHC constituído por segmentos das linhagens JFH1 (genótipo 2a; GenBank nº AB047639) e J6/CF (genótipo 2a; GenBank nº AF177036). O Jc1-Fluc codifica uma poliproteína do VHC que consiste em: proteína do nucleocapsídeo, E1, E2 e p7 derivadas do J6/CF e NS3 a NS5B proteínas de JFH1. O *crossover* entre os genótipos 2a isolados está localizado em NS2

resultando na produção de uma proteína NS2 quimérica. A replicação e infecção de Jc1-Fluc podem ser monitoradas com ensaios simples de gene repórter devido à inserção de um gene codificando *firefly luciferase*.

Figura 8. A figura representa a construção da poliproteína do plasmídeo Jc1; as partes em negrito representam a formação quimérica do segmento J6/CF. Abaixo a poliprotéina do vírus do genótipo 2a da linhagem do vírus de hepatite fulminante japonês JFH1.

Fonte: Arquivo pessoal Sandra Ciesek.

3.5 Preparação dos plasmídeos

3.5.1 Transformação de bactérias

Inicialmente foram misturados 10 µL da solução de DNA plasmidiano com 100 µL da bactéria competente (E. coli HD5); essa mistura foi deixada em gelo por meia hora em um tubo *eppendorf*[®]. Em seguida, transferiu-se o tubo para o misturador a 42 °C por um minuto (min) e novamente foi incubado em gelo por 5 min. Adicionou-se então 1 mL de meio Lúria-Bertani (LB) sem antibiótico e a mistura foi incubada a 37 °C por uma hora. Em seguida centrifugada por 30 s a 1400 rpm.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 100 µL de meio LB com ampicilina (Amp). A bactéria foi

plaqueada em Agar-LB contendo antibiótico e a placa foi incubada em estufa a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, escolheu-se uma colônia pequena e isolada. Com ajuda de uma ponteira, a colônia foi colocada em 2 mL de meio LB+Amp em um tubo que permitia a entrada de oxigênio e incubada no misturador a 37 °C por 4 horas.

3.5.2 Preparação de plasmídeos- Midiprep

Este método foi utilizado para produção de plasmídeos de até 100 µg como o JFH1-NS3-5B, JC1-Fluc, Con1 e recombinantes. Os 2 mL da cultura em tubo foram transferidos para um frasco com 100 mL de meio LB+Amp e incubados no misturador a 37 °C por 24h. No dia seguinte, a cultura foi transferida para tubos de centrífuga de 250 mL e centrifugada a 45000 rpm a 4 °C por 30 min.

Em seguida, descartou-se o sobrenadante e os tubos foram levados ao freezer -20 °C por 20 min. Logo após, o *pellet* foi ressuspendido com 5 mL do Tampão A1 (Qiagen, Midprep kit, com RNase) e a suspensão transferida para tubos de centrífuga de 50 mL. A ela foram adicionados 5 mL do Tampão A2 (lise) e o tubo invertido gentilmente e incubado por 5 min. Posteriormente, 5 mL do Tampão A3 (estabilização) foram adicionados e o tubo invertido gentilmente. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C, 30 min e o sobrenadante transferido para um tubo *Falcon* (50 mL). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e utilizado para isolamento do DNA.

Para isto, foi utilizado o kit Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid (Düren, Alemanha). O volume total de cada amostra foi dividido em 4 colunas de

700 µL e em seguida as colunas foram centrifugadas a 11000 rpm por 1 min. O líquido resultante no tubo coletor foi dispensado e esse procedimento foi repetido até acabar o filtrado. As colunas foram em seguida lavadas com 500 µL do tampão AW (pré-aquecido a 50 °C no micro-ondas) por duas vezes e centrifugadas a 11000 rpm por 1 min. As colunas foram lavadas com 700 µL do tampão A4 (com etanol) e centrifugadas a 11000 rpm por 1 min. Para secar as colunas, realizou-se uma centrifugação a velocidade máxima por 2 min. O DNA da membrana foi recuperado com 50 µL de água *mQ* estéril. O DNA foi quantificado no *Nanodrop*[®] e guardado em freezer (-20 °C) até a realização da transcrição do RNA.

3.5.3 Preparação de plasmídeos- Maxiprep

O DNA dos plasmídeos utilizados para o ensaio de pseudo-partículas HIV-gag-pol; CSFluc; PcDNA3.0; H77 e VSVG foram recuperados por esse método. Os 2 mL da cultura em tubo foram transferidos para um frasco com 200 mL de meio LB+Amp e incubados no misturador a 37 °C por 24h. No dia seguinte, foram transferidos para tubos de centrífuga de 500 mL e centrifugados a 6000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram em seguida congelados a -20 °C por 20 min. Para isolamento do DNA foi utilizado o kit HiSpeed Plasmid Maxi Kit (cat. nº 12662) seguindo as normas do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). O DNA foi quantificado no *Nanodrop*[®] e guardado em freezer (-20 °C) até sua utilização.

3.5 Transcrição *in vitro* (JC1-Fluc, JFH1-NS35B e recombinantes)

3.5.1 Linearização

Foram utilizados de 5 a 10 µg de DNA do plasmídeo e a ele foi adicionado 10 µL do tampão NEB e 2 µL Enzima de restrição (MLuI). O volume foi ajustado para 100 µL com água. A mistura foi incubada por 1h a 37 °C. Para checar a linearização do DNA foi utilizado gel de agarose 1%. Em cada poço foi colocado 2 µL da amostra + 5 µL de Tampão + 5 µL de água e corrido em eletroforese a 120 v por 5 min.

3.5.2 Extração do DNA

Após linearização, 100 µL de amostra foram adicionados a 100 µL de água, 20 µL de (1/10 vol) NaOAc 3 M (pH 5,2) e 200 µL de TE-fenol (fase inferior). Em seguida, o tubo foi misturado no *Vortex* e centrifugado a 13.500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. A fase superior da mistura foi transferida para um novo tubo e acrescentou-se 200 µL de TE-fenol (fase inferior) e após o *Vortex* foi novamente centrifugado a 13.500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. A fase superior da mistura foi transferida para um tubo novo e a ela foram acrescentados 200 µL de Clorofórmio (gelado) e após o *Vortex* foi centrifugada a 13.500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Outra vez, transferiu-se a fase superior para um tubo novo e 2,5x o volume final de etanol

100% (precipitação do DNA) foram adicionados, o tubo foi invertido gentilmente e incubado no freezer a -20 °C por 20 min.

Após, o tubo foi centrifugado a 13.500 rpm por 3 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 200 µL de etanol 80% e centrifugado a 13.500 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo colocado no misturador por 5 min a 37 °C para a secagem do *pellet*. O *pellet* foi dissolvido em 70 µL de água *mQ* estéril. Para checar a extração e integridade do DNA foi utilizado gel de agarose 1%. Em cada poço foi colocado 2 µL da amostra + 5 µL de Tampão + 5 µL de água e corrido em eletroforese a 120 v por 5 min.

3.5.3 Transcrição in vitro

Após extração do DNA, 68 µL de amostra foram adicionados a 20 µL de tampão 5x RRL [400 mM de HEPES (pH 7.5), 60 mM de MgCL₂ 10 mM spermidina; 200 mM DTT] e 12,5 µL de solução de rNTP (25 mM cada NTP), 2,5 de RNAasin - inibidor de RNase (Promega 40 U/ µL) e 6 µL de T7-RNA-Polimerase [Promega, 15 U/ µL - 4 µL + 2 µL após 2h]. Essa mistura foi incubada por 2 horas a 37 °C. E a ela foram adicionados mais 3 µL de T7-RNA-Polimerase e novamente incubada por 2 horas a 37 °C. Após esse período foram acrescentados 7,5 µL de DNAase (Promega, RNase free, 1 U/ µL) e a mistura foi incubada por mais 30 min a 37 °C.

3.5.4 Extração do RNA

Após transcrição, aos 100 µL de amostra foram acrescentados 60 µL de NaOAc 2M (pH 4,5), 440 µL de água e 440 µL de fenol (saturado de água, pH<5); essa mistura foi colocada no *Vortex* e centrifugada a 13,500 rpm por 10 min a 4 °C. Em seguida, a fase superior foi transferida para um tubo novo e acrescentada a 1x o volume de Clorofórmio (gelado), misturada no *Vortex* e centrifugada a 13.500 rpm por 3 min.

Novamente, a fase superior foi transferida para um tubo novo e acrescentada a 0,7 x volume de isopropanol (temperatura ambiente), os tubos foram invertidos para a precipitação do RNA e centrifugados a 13.500 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200 µL de etanol 70%. O tubo foi novamente centrifugado a 13.500 rpm, 5 a 10 min, temperatura ambiente. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e o tubo colocado em misturador por 5 min a 37 °C para a secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuspendido em água e a integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e corrido em eletroforese 120 V por 5 min. O RNA foi quantificado no *Nanodrop*[®] e estocado em freezer -80 °C até seu uso.

3.6 Ensaio de Citotoxicidade

Uma linhagem celular de Huh7.5, expressando um gene repórter que codifica *firefly luciferase* (Huh7.5-VSV-Fluc), foi utilizada para o ensaio de citotoxicidade. As células foram semeadas em placas de cultura com 12 poços a

uma densidade de 6×10^4 e no dia seguinte diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas e incubadas por 48 h. Após este período, os poços foram lavados com 1x PBS e em seguida foi adicionado o tampão de lise. As placas foram guardadas em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a medida de intensidade de luciferase. Para o YHK foram utilizadas concentrações de 0 a 2000 $\mu\text{g/ mL}$, para o ácido glicirrizínico de 0 a 1000 $\mu\text{g/ mL}$ e para o Notoginsenoside R1 e Pinoresinol de 0 a 500 $\mu\text{g/ mL}$.

3.7 Preparação de pseudo-partículas retrovirais (VHCpp - Entrada)

Pseudotipos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) expressando glicoproteínas do vírus da estomatite vesicular (pczVSV-G19 / VSV-G), proteínas do envelope (pcDNA3cE1E2-J6CF / H77) ou vetor vazio (pcDNA3.0) foram produzidos por cotransfecção utilizando-se *Polietilenoimina* (PEI). Células 293T foram semeadas em placas de 6 poços um dia antes da transfecção. A transfecção foi feita utilizando-se 2.7 μg da construção plasmídica expressando a proteína do envelope ou VSV-G e um vetor retroviral transdutor de *firefly luciferase* e ainda 2.7 μg de gag/ pol HIV. O meio foi trocado após 6 horas. Os sobrenadantes contendo as pseudo-partículas foram coletados 48 h e 72 h após a transfecção e utilizados para infectar células Huh7.5 (48).

3.8 Ensaio de Replicação Viral / Produção de partículas infectantes

Células Huh7.5 foram transfectadas por eletroporação com o genoma do repórter viral carregando o gene da luciferase (JFH1-NS3-5B;Jc1-Luc) ou com os recombinantes. Para medir a replicação as células transfectadas foram semeadas em placas de 6 poços. Após 4 horas diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas a cultura. A replicação foi medida pela atividade da luciferase após 48 horas. Para os ensaios com o plasmídeo JC1-Fluc (genoma completo) após as primeiras 4 h de incubação as placas foram transferidas para o laboratório de segurança nível 3 (S3) e após 48 horas o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtros de 0,45 µm e utilizado para reinfectar células Huh7.5 (ensaio de liberação de partículas virais). Para produção de partículas infectantes de JC1-Fluc e recombinantes após a eletroporação as células foram colocadas em pratos de 10 mm² e o sobrenadante coletado e filtrado após 72 h; vírus foram mantidos em estoque em freezer -80 °C.

3.9 Ensaio de infecção do VHC

Células Huh7.5 “naïve” foram distribuídas com uma densidade de 6×10^4 em placas de 12 poços com DMEM. No dia, células foram incubadas com 500 µL do sobrenadante contendo o vírus (sobrenadante obtido no item 3.8) na ausência e presença dos compostos por 8 horas. O meio foi trocado e as células mantidas em cultura por 48 horas. Os poços foram lavados com 1x PBS

(tampão fosfato-salino) e em seguida foi adicionado o tampão de lise. As placas foram guardadas em freezer -20 °C até a medida de intensidade de luciferase. O ensaio com infecção dos recombinantes foi feito através do ensaio de dose infecciosa das culturas de tecidos a 50 % (*50 % tissue culture infective dose - TCID50*) devido a ausência de gene repórter nesses constructos.

3.10 Ensaio de dose infecciosa das culturas de tecidos a 50 % (50 % *Tissue Culture Infective Dose* -TCID50)

Células HuH7.5 foram semeadas em placas de 96 poços no dia anterior a infecção numa densidade de 6×10^3 . Os inóculos foram diluídos serialmente em uma razão de 10. Foram feitas 6 replicatas para cada diluição. Após três dias, foi detectada a NS5A das amostras por imunohistoquímica como descrito a seguir. Os títulos virais foram determinados calculando a TCID50 através do método de Reed and Munch (49).

3.11 Imunohistoquímica – NS5A

As placas foram lavadas por três vezes com PBS e fixadas metanol gelado por 10 min. Em seguida, foram permeabilizadas com 0,2 % de Triton X-100 diluído em PBS por três vezes, 10 min. As amostras foram bloqueadas com 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 60 min. Em seguida, foi aplicado o anticorpo primário monoclonal de rato anti-NS5A diluído em 0,5 % BSA e logo após o anticorpo secundário conjugado de HRP anti-rato imunoglobulina G.

3.12 Ensaio de Luciferase

As células infectadas ou transfectadas em placas de 6 ou 12 poços foram lavadas com tampão de salina (1x PBS) e lisadas com 1000 μL / aro (placa de 6 poços) ou 350 μL / aro (placa de 12 poços) com tampão de lise (1% Triton X-100, 25 mM glicina, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA e 1 mM DTT, pH 7.8). Após o descongelamento das placas, 100 μL do lisado celular foi colocado em um tubo contendo 360 μL do tampão de ensaio (25 mM glicina, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP e 15 mM K_2PO_4 , pH 7.8), em seguida, foi adicionado 200 μL da solução de luciferina (200 μM luciferina, 25 mM glicina, pH 8.0). A atividade da luciferase foi medida por 20 s em um luminômetro (Lumat LB9507; Berthold, Freiburg, Germany). Todas as medidas foram feitas em duplicatas (replicação) ou quadruplicatas (infecção).

3.13 Biossegurança

Por se tratar de um estudo com partículas virais os experimentos seguiram protocolos previamente definidos. Os experimentos com pseudopartículas e de replicação viral foram realizados em laboratório com nível de segurança 2. Todos os materiais usados para geração, transfecção e infecção foram autoclavados e depois destinados à incineração.

Os experimentos realizados com vírus completos foram realizados em laboratório com nível de segurança 3 e os pesquisadores foram previamente orientados sobre os equipamentos de proteção individual e destino correto dos materiais.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de citotoxicidade

Não foram observados efeitos tóxicos em nenhum dos compostos nas concentrações utilizadas (Figura 9), muito embora, nos experimentos que incluíram eletroporação as altas concentrações apresentaram efeito tóxico.

Figura 9. Ensaio de Citotoxicidade dos compostos. Os gráficos indicam a medida de luciferase após 48h de incubação com as diferentes concentrações dos compostos. Uma linhagem celular de Huh7.5 que expressa o gene repórter que codifica *firefly luciferase* (Huh7.5-VSV-Fluc), foi utilizada para o ensaio. Os gráficos demonstram ausência de toxicidade nas concentrações utilizadas.

4.2 Entrada do vírus (VHCpp)

Os compostos não alteraram a entrada do vírus na célula (Figura 10).

Figura 10. Ensaio de Pseudo partículas- VHCpp. VHCpp foram geradas através da co-transfecção de três plasmídeos em células 293T: gag-pol genes do HIV, um genoma do retrovírus contendo apenas a parte terminal, um gene repórter e o sinal de empacotamento e as proteínas de interesse. As pseudopartículas carregavam as glicoproteínas do envelope do VHC E1/E2, ou um vetor vazio (controle negativo), ou ainda as proteínas do vírus da estomatite vesicular (controle positivo). Não houve diferenças na entrada do vírus na célula na presença dos compostos.

4.3 Replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B

Não houve diferenças na replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B na presença do YHK ou dos compostos ativos de seus ingredientes (Figura 11).

Figura 11. Ensaio de Citotoxicidade dos compostos e replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B. Os gráficos indicam a ausência de toxicidade nas concentrações utilizadas, bem como ausência de diferenças na replicação do subgenoma JFH1-NS3-5B na presença do YHK ou dos compostos. O subgenoma foi eletroporado em células Huh7.5 e após o período de incubação com os compostos a cultura foi lisada e utilizada para medição de luciferase. Os resultados são apresentados pela média da quantificação de luciferase em cada amostra (log_{10} unidade relativa de luciferase URL/ poço).

4.4 Con1-NS5

Os compostos Pinoresinol e Notoginsenoside-R1 apresentaram um pequeno efeito na diminuição da replicação de Con1 a partir de 200mg/ml (Figura 12).

Figura 12. Ensaio de replicação do subgenoma Con1 em células HuH7.5. Os compostos Pinoresinol e Notoginsenoside-R1 apresentaram efeito moderado diminuindo a replicação de Con1. Os resultados são apresentados pela média da quantificação de luciferase em cada amostra ($\log_{10}$ unidade relativa de luciferase URL/ poço).

4.5 JC1-Fluc – replicação e liberação de novas partículas virais

Os compostos não apresentaram efeito significativos na replicação ou liberação/infecção do vírus, (Figura 13).

Figura 13. Gráficos representando a replicação e infecção do JC1-Fluc em células Huh7.5. A linha azul representa o ensaio de replicação do genoma viral após eletroporação do RNA viral e a vermelha representa a infecção de novas células com o sobrenadante das células eletroporadas. Os resultados são apresentados pela média da quantificação de luciferase em cada amostra (log₁₀ unidade relativa de luciferase URL/ poço).

4.6 Infecção de diferentes genótipos do VHC na presença de YHK

O YHK não apresentou efeito na infecção dos vírus recombinantes dos diferentes genótipos do VHC.

Figura 14. O gráfico representa o título do VHC após a infecção dos diferentes genótipos na presença de diferentes concentrações de YHK. A infecção foi detectada pela presença da proteína NS5A por imunohistoquímica. A TCDI50 foi calculada pelo método de Reed e Munch.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a terapia da hepatite C sofreu uma verdadeira revolução com a chegada das novas drogas inibidoras das proteínas virais também conhecidas como agentes antivirais diretos (AADs). Os primeiros AADs aprovados foram o telaprevir e boceprevir, medicamentos que imitam a NS3-NS4A substrato natural da protease do VHC genótipo 1 e promovem a inibição do início do processo de replicação do vírus (50). Atualmente também foram aprovados o Dataclasvir e o Simeprevir.

Esta nova terapia possibilitou o aumento da resposta viral sustentada, ausência de RNA viral após 6 meses de tratamento, de 40% para aproximadamente 80%. E apesar de os resultados terapêuticos terem melhorado dramaticamente ainda estão longe de serem ideais. Persistem problemas como o alto custo, os efeitos colaterais, as interações medicamentosas, bem como, resistência e intolerância. Isto associado à falta de uma vacina protetora, o que é explicado pela heterogeneidade viral, levam a necessidade do desenvolvimento de uma terapia mais barata, melhor tolerada e eficaz (51).

Indo de encontro aos AADs terapias que utilizam como alvo o hospedeiro vem sendo desenvolvidas. A terapia clássica de hepatite C baseia-se na combinação de dois compostos que utilizam como alvo o hospedeiro: Interferon- α (IFN- α), que desencadeia uma cascata de acontecimentos

intracelulares que, por sua vez, ativam uma série de efetores celulares não específicos antivirais, e a Ribavirina, uma droga que acelera a liberação de células infectadas ou inibe a produção do VHC por mecanismos ainda desconhecidos (52, 53).

Durante o ciclo de replicação do VHC muitas proteínas do hospedeiro são utilizadas e o bloqueio da interação de qualquer um destes componentes celulares resulta em inibição eficiente de produção viral, tal como demonstrado *in vitro* com inibidores específicos ou com silenciamento do RNA. Muito embora isso permita que vários novos compostos sejam desenvolvidos, apenas dois estão em fase clínica de estudo: a ciclofilina A que apresenta função de isomerase e os antagonistas do miR-122. Ambos reduzem a replicação viral quando administrados aos pacientes infectados em Fase Ib e II de ensaios clínicos (54).

A associação do aumento da lipogênese com a hepatite C e a participação dos lipídios em diversas fases do ciclo de replicação viral abriu portas para pesquisa com drogas que interagem com o metabolismo lipídico. As estatinas são drogas utilizadas amplamente para o tratamento de hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (55). Estudos *in vitro* demonstraram que as estatinas são capazes de inibir a replicação de VHC replicons subgenômicos, suprimir a replicação do RNA, além de apresentar um efeito sinérgico com IFN α (56, 57).

Embora os testes *in vitro* tenham demonstrado um bom desempenho das estatinas como inibidores do VHC, os estudos clínicos apresentaram resultados modestos. Estudos feitos com monoterapia de estatinas não confirmaram a

redução dos níveis de RNA viral nos pacientes. Na terapia combinada, os estudos foram conduzidos de duas formas: a primeira com trabalhos retrospectivos com pacientes que fizeram tratamento para Hepatite C e que já utilizavam estatinas onde foi encontrado um índice positivo entre o uso da estatina e a resposta viral sustentada. E a segunda em estudos prospectivos randomizados que apresentaram discordância quanto a esse índice (58).

Levando em conta essa íntima associação entre metabolismo lipídico e o VHC, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do composto natural *Yo Jyo Hen Shi ko* nos modelos *in vitro* de hepatite C. Trabalhos experimentais realizados anteriormente por nosso grupo com o YHK relataram a inibição do desenvolvimento da esteato-hepatite, a redução dos marcadores de estresse oxidativo e da inflamação, melhora nas concentrações de aminotransferases e diminuição da gordura visceral em modelos experimentais com ratos obesos. Reportamos também a modulação de genes de exportação e da síntese *de novo* de lipídios por este composto (44-46).

Este composto natural é uma formula com três ingredientes e a fim de elucidar um possível efeito de apenas um dos componentes utilizamos substâncias ativas de cada um: *Panax pseudo ginseng* - Notoginsenoside R1 (NTR1), *Eucommia ulmoides* - ($\pm$) Pinoresinol (Pino), Raiz de Licorice - Ácido Glicirrizínico (GL).

O Notoginsenoside R1 é a principal substância ativa do *Panax notoginseng* e é utilizado na medicina oriental para o tratamento de doenças relacionadas a distúrbios circulatórios. Em um modelo experimental de aterosclerose o NTR1 foi capaz de reduzir as concentrações de colesterol e

triglicérides bem como aumentar a concentração de HDL (59, 60). O pinoresinol é uma lignina com efeitos anti-inflamatórios e antioxidativos apresentando efeito hepático protetor (61).

A glicirrizina tem sido usada na medicina japonesa como medicamento para diversas doenças bem como para hepatite C há anos. Trabalhos clínicos evidenciam a diminuição dos níveis de aminotransferases em pacientes que receberam glicirrizina intravenosa. Já os experimentos *in vitro* descrevem a glicirrizina como composto anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, hepatoprotetor e antiviral (62). O efeito antiviral foi descrito para diferentes tipos de vírus (Herpes, HIV, SARS), todavia, para o VHC seu efeito é moderado. Ashfaq e colaboradores (2011) demonstraram que a glicirrizina foi capaz de inibir o RNA do VHC genótipo 3a e a expressão da proteína do Core, além de apresentar efeito sinérgico com o IFN α , neste estudo foi usado soro de pacientes portadores de hepatite C com genótipo 3a o que representa uma limitação dos resultados já que a replicação do vírus em cultura é limitada (63).

Recentemente, Matsumoto e col. (2013) mostraram que a glicirrizina diminui a infectividade extracelular e aumenta a intracelular. Ainda observou-se um aumento de LDs no RE, indicando redução na liberação de novas partículas virais. Não foram encontradas diferenças na entrada e replicação viral o que corrobora com os resultados aqui apresentados (64).

Neste estudo utilizamos técnicas de cultura celular que mimetizam todas as fases do ciclo de replicação do VHC. Para avaliar a entrada celular pseudopartículas expressando as glicoproteínas do envelope (E1/E2) foram

utilizadas, nenhuma diferença significativa na entrada dos vírus em presença dos compostos foi observada.

Para determinar o efeito dos compostos utilizamos o sistema de replicons. O replicon JFH1-NS3-5B representa o genótipo 2a e como observado os compostos não apresentaram efeito inibidor, alguns pontos dos gráficos possuem valores menores devido à técnica de detecção de luciferase ser em parte manual, pequenas variações são comumente observadas, porém essas variações podem ocultar um pequeno efeito inibitório. No presente estudo optamos por considerar esse efeito negativo já que ele seria modesto em relação a substâncias inibitórias do VHC. O mesmo ocorre com o Con1-NS5 que representa o genótipo 2b onde o Pino e o NTR1 apresentaram um pequeno efeito dose-dependente que por não passar de 1 log foi considerado negativo. Por fim, avaliamos os compostos na replicação do genoma completo e a liberação de novas partículas virais JC1-Fluc e mais uma vez não encontramos diferenças.

A utilização de compostos naturais na medicina sempre foi controversa, entretanto seu uso é extremamente difundido na medicina oriental. Vários produtos à base de plantas medicinais e suplementos foram identificados com potencial antiviral e / ou efeitos bioquímicos no tratamento de infecção por hepatite C crônica. Estudos clínicos com a decocção Bing Gan em combinação com IFN α bem como com oxymatrina sozinha demonstraram maior *clearence* do VHC no que tratamento quando comparados ao controle. A normalização das enzimas hepáticas foi observada durante o tratamento com a vitamina E,

Glycyrrhiza glabra, CH100, decocção Yi Zhu e decocção Yi Er Gan. Porém, todos esses resultados apresentam limitações.

Devido à ausência de resultados bem delineados e tendo em vista os resultados das terapias anti-VHC atuais e futuras, é improvável que compostos naturais sejam utilizados ou chegarão ao desenvolvimento clínico nesta indicação. O projeto deste trabalho foi organizado antes do advento das novas drogas para o VHC, quando ainda era justificável a busca por terapias alternativas, os novos medicamentos já aprovados em conjunto com os que estão em fase final de pesquisa reorganizam o quadro de tratamento da hepatite C tornando-a uma doença curável.

6. CONCLUSÃO

1. O composto natural Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) não apresentou efeito na entrada, replicação e infecção do vírus da hepatite C em cultura celular;
2. As substâncias ativas dos ingredientes do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK): Notoginsenoside R1 (NTR1), o ($\pm$) Pinoresinol e Ácido Glicirrizínico não apresentam efeito nas diferentes fases do ciclo de replicação do vírus da hepatite C em cultura celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. Hepatitis C global prevalence (update). Weekly Epidemiological Record. 1999. p. 425
2. Brasil MdS. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde 2007.
3. Boesecke C, Rockstroh JK. Treatment of acute hepatitis C infection in HIV-infected patients. Curr Opin HIV AIDS. 2011;6(4):278-84.
4. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. Hepatology. 1997;26(3 Suppl 1):15S-20S.
5. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. Hepatology. 2002;36(5 Suppl 1):S21-9.
6. Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. Hepatology. 2002;36(5 Suppl 1):S1-2.
7. Pawlotsky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. Curr Opin Infect Dis. 2003;16(6):587-92.
8. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. Hepatology. 2002;36(5 Suppl 1):S35-46.
9. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Lancet. 1997;349(9055):825-32.

10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62.
11. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40835-43.
12. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11(7):791-6.
13. Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, et al. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol*. 2009;83(13):6922-8.
14. Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology*. 2010;53(1):66-9.
15. Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*. 2006;25(27):3834-47.
16. Duvet S, Op De Beeck A, Cocquerel L, Wychowski C, Cacan R, Dubuisson J. Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 occurs posttranslationally in a mannosylphosphoryldolichol-deficient CHO mutant cell line. *Glycobiology*. 2002;12(2):95-101.
17. Walewski J, Kraszewska E, Mioduszevska O, Romejko-Jarosińska J, Hellmann A, Czyz J, et al. Rituximab (Mabthera, Rituxan) in patients with recurrent indolent lymphoma: evaluation of safety and efficacy in a multicenter study. *Med Oncol*. 2001;18(2):141-8.

18. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-73.
19. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology*. 2009;49(2):364-77.
20. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, 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*. 1993;74 (Pt 11):2391-9.
21. Hnatyszyn G. [Effectiveness of complex screening procedure in the diagnostics of cerebral palsy in preterm infants with suspected hypoxic-ischaemic brain injury]. *Med Wieku Rozwoj*. 2005;9(3 Pt 1):293-310.
22. Murphy RA, Sunpath H, Kuritzkes DR, Venter F, Gandhi RT. Antiretroviral therapy-associated toxicities in the resource-poor world: the challenge of a limited formulary. *J Infect Dis*. 2007;196 Suppl 3:S449-56.
23. Popescu CI, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell*. 2010;102(1):63-74.
24. Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology*. 2012;55(4):998-1007.
25. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):688-700.

26. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007;446(7137):801-5.
27. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009;457(7231):882-6.
28. Ray K. Hepatitis: NPC1L1 identified as a novel HCV entry factor. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(3):124.
29. Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10777-82.
30. Wong-Staal F, Syder AJ, McKelvy JF. Targeting HCV entry for development of therapeutics. *Viruses*. 2010;2(8):1718-33.
31. Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe*. 2011;9(1):32-45.
32. Bühler S, Bartenschlager R. [Molecular mechanisms of hepatitis C virus (HCV) replication - implications for the development of antiviral drugs]. *Z Gastroenterol*. 2011;49(7):836-44.
33. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*. 2011;19(2):95-103.
34. Lindenbach BD. Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:199-218.

35. Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol.* 2011;8(2):258-69.
36. Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RD. Lipids and HCV. *Semin Immunopathol.* 2012.
37. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol.* 2005;13(4):159-63.
38. Cheng Y, Dharancy S, Malapel M, Desreumaux P. Hepatitis C virus infection down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1A. *World J Gastroenterol.* 2005;11(48):7591-6.
39. Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(1):33-40.
40. Borchers AT, Sakai S, Henderson GL, Harkey MR, Keen CL, Stern JS, et al. Shosaiko-to and other Kampo (Japanese herbal) medicines: a review of their immunomodulatory activities. *J Ethnopharmacol.* 2000;73(1-2):1-13.
41. Chan P, Tomlinson B. Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*). *J Clin Pharmacol.* 2000;40(5):457-61.
42. Kim BH, Park KS, Chang IM. Elucidation of anti-inflammatory potencies of *Eucommia ulmoides* bark and *Plantago asiatica* seeds. *J Med Food.* 2009;12(4):764-9.
43. Chande N, Laidlaw M, Adams P, Marotta P. Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) improves transaminases in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a randomized pilot study. *Dig Dis Sci.* 2006;51(7):1183-9.

44. de Lima VM, de Oliveira CP, Sawada LY, Barbeiro HV, de Mello ES, Soriano FG, et al. Yo jyo hen shi ko, a novel Chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine-choline-deficient diet. *Liver Int.* 2007;27(2):227-34.
45. Stefano JT, de Oliveira CP, Correa-Giannella ML, de Lima VM, de Sa SV, de Oliveira EP, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in ob/ob mice treated with yo jyo hen shi ko (YHK): effects on peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Dig Dis Sci.* 2007;52(12):3448-54.
46. Pereira IVA, De Oliveira CPMS, Stefano JT, Debas V, Halla NC, Alves JAF, et al. Yo jyo hen shi ko (YHK) modulates the expression of proteins involved in de novo lipogenesis and lipid exportation in experimental nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences.* 2013;3(1):48-58.
47. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology.* 2009;49(2):364-77.
48. Ciesek S, Steinmann E, Iken M, Ott M, Helfritz FA, Wappler I, et al. Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1875-84.
49. H R. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 1938. p. 493–7.

50. Bacon BR, McHutchison JG. Into the light: strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care*. 2007;13 Suppl 12:S319-26.
51. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):453-63.
52. Thomas E, Ghany MG, Liang TJ. The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother*. 2013;23(1):1-12.
53. Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:321-42.
54. Pawlotsky JM. What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014;105:22-5.
55. Schaefer EA, Chung RT. HCV and host lipids: an intimate connection. *Semin Liver Dis*. 2013;33(4):358-68.
56. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, et al. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2008;197(3):361-70.
57. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology*. 2006;44(1):117-25.
58. Verpaalen B, Neyts J, Delang L. Are statins a viable option for the treatment of infections with the hepatitis C virus? *Antiviral Res*. 2014;105:92-9.
59. Gu B, Nakamichi N, Zhang WS, Nakamura Y, Kambe Y, Fukumori R, et al. Possible protection by notoginsenoside R1 against glutamate neurotoxicity

mediated by N-methyl-D-aspartate receptors composed of an NR1/NR2B subunit assembly. *J Neurosci Res.* 2009;87(9):2145-56.

60. Jia C, Xiong M, Wang P, Cui J, Du X, Yang Q, et al. Notoginsenoside R1 attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model. *PLoS One.* 2014;9(6):e99849.

61. Kim HY, Kim JK, Choi JH, Jung JY, Oh WY, Kim DC, et al. Hepatoprotective effect of pinorexinol on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(1):105-12.

62. van Rossum TG, Vulto AG, de Man RA, Brouwer JT, Schalm SW. Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12(3):199-205.

63. Ashfaq U, Masoud M, Nawaz Z, Riazuddin S. Glycyrrhizin as antiviral agent against Hepatitis C Virus. *Journal of Translational Medicine.* 2011;9(1):112.

64. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, et al. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PLoS One.* 2013;8(7):e68992.