

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 21/12/2022.

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeito de compostos naturais bioativos sobre o
metabolismo lipídico e a produção de estresse
oxidativo durante a replicação do vírus da
hepatite C em cultura celular – VHCcc**

Moema de Souza Santana

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências
Nutricionais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da
Costa.

Araraquara

2020

Efeito de compostos naturais bioativos sobre o metabolismo lipídico e a produção de estresse oxidativo durante a replicação do vírus da hepatite C em cultura celular – VHCcc

Moema de Souza Santana

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa.

Araraquara

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito de compostos naturais bioativos sobre o metabolismo lipídico e a produção de estresse oxidativo durante a replicação do vírus da hepatite C em cultura celular – VHCcc

AUTORA: MOEMA DE SOUZA SANTANA

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. MARJORIE DE ASSIS GOLIM (Participação Virtual)

Hemocentro / Faculdade de Medicina - UNESP Botucatu

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participação Virtual)

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE DA SILVA (Participação Virtual)

Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Araraquara, 21 de dezembro de 2020

S232e

Santana, Moema de Souza.

Efeito de compostos naturais bioativos sobre o metabolismo lipídico e a produção de estresse oxidativo durante a replicação do vírus da hepatite C em cultura celular – VHCcc / Moema de Souza Santana. – Araraquara: [S.n.], 2020.
127 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

1. VHC. 2. Hepatite C. 3. Estresse oxidativo e apoptose. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

Agradecimentos Pessoais

Agradeço a Deus pelo cuidado sem fim durante todo meu caminho em busca da realização dos meus sonhos.

Aos meus pais Pedro Jackson e Geraldina Batista pelo dom da vida e pelos exemplos de caráter, dignidade e força.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa pelo acolhimento, generosidade e exemplo de honestidade, ética e amor pela ciência.

Ao amor da minha vida Iuri Lima Aiura pelo companheirismo, carinho e apoio e à minha querida sogra pela força e alegria.

Aos amigos fieis que cultivei em Araraquara em especial a Rute Lopes, Carla Cruz, Rafael Fulindi e Carolina Ribeiro pelo companheirismo, apoio e convívio amoroso.

A todos os colegas de laboratório e de curso por todo apoio e companheirismo durante o desenvolvimento do projeto e cursada das disciplinas.

Aos amigos e aos familiares que deixei na Bahia e que fazem presentes mesmo em distância, me dando a força necessária para prosseguir diante da certeza de apoio e de aconchego no retorno para casa.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo: 2017/04500-9) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001; Processo: 250 - 10/2017) pelas bolsas concedidas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa pela orientação no planejamento e execução desse trabalho.

A minha colega Rute Lopes pelo apoio incondicional e acolhimento durante todas as etapas de realização desse trabalho.

Aos docentes da Pós-graduação em Alimentos e Nutrição pelo ensino, dedicação e conhecimento compartilhado.

À sessão de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição pela disponibilidade, apoio e eficiência nas orientações.

***“Toda caminhada começa no primeiro passo.
A natureza não tem pressa segue seu
compasso, inexoravelmente chega lá.”***

(Santanna. A natureza das coisas, 2007).

Resumo

Introdução: As complicações relacionadas à cronicidade de hepatite C estão associadas com o aumento do estresse oxidativo promovido pelo Vírus da Hepatite C (VHC), que causa danos ao DNA, alterações na peroxidação lipídica e está associada a morte celular. O resvetrarol (RVT) apresenta ampla ação antioxidante, e potencial de síntese de derivados. O f-resveratrol, derivado RVT com a adição de uma molécula de fluor apresenta atividade antioxidante promissora. A taurina (TAU) destaca-se pela ação que desempenha na estabilidade da membrana plasmática, a reprodução, a imunidade. **Objetivo:** Avaliar o efeito do RVT, do F-RVT e da TAU sobre o perfil de morte celular e a replicação do VHC. **Métodos:** Trabalho desenvolvido utilizando células Huh-7.5 e células Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1. Os CNBs analisados foram o RVT, F-RVT e TAU. A viabilidade celular foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de MTT. O mecanismo de apoptose e necrose foi analisado por citometria de fluxo. A quantificação de RNA do VHC, nas células SGR-JFH1 sem tratamento e pós-tratamento, foi realizada por ensaio de PCR em tempo real. Aplicou-se o modelo de análise de variância. Foi aplicado d.m.s. do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. **Resultados:** O controle positivo (H_2O_2) apresentou expressiva citotoxicidade, morte celular de aproximadamente 80% nas células SGR-JFH1 e de 95% nas células Huh-7.5. Os compostos apresentaram tendência de indução de apoptose precoce pelos tratamentos com os CNBs nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as concentrações testadas. Houve ausência de influência dos tratamentos com os CNBs sob o padrão de necrose das células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as concentrações testadas. Verificou-se ainda redução da carga viral intracelular como efeitos dos tratamentos com RVT, F-RVT e TAU em 1 dia em tratamentos. **Conclusão:** Os compostos estudados apresentaram efeito sobre a indução de apoptose precoce e sobre a redução da carga viral intracelular do VHC.

Palavras-Chave: VHC, Hepatite C, estresse oxidativo e apoptose.

Abstract

Introduction: Complications related to the chronicity of hepatitis C are associated with increased oxidative stress promoted by the Hepatitis C Virus (HCV), which causes DNA damage, changes in lipid peroxidation and is associated with cell death. Resvetrarol (RVT) has a broad antioxidant action and derivatives synthesis potential. The f-resveratrol derivative RVT with the addition of a fluoride molecule presents promising antioxidant activity. Taurine (TAU) stands out for the action it plays on the stability of the plasma membrane, reproduction, immunity. **Objective:** To evaluate the effect of RVT, F-RVT and TAU on cell death profile and HCV replication. **Methods:** The study was developed using Huh-7.5 cells and Huh-7.5 cells expressing the SGR-JFH1 subgenomic replicon. The viability analysis of the cells was analyzed by means of the MTT colorimetric assay. Apoptosis and necrosis mechanism analysis was performed by flow cytometry. The quantification of HCV RNA was performed in SGR-JFH1 cells without treatment and after treatment. The variance analysis model was applied. The contrast between means was done by the d.m.s. of the Tukey test at 5% probability level. **Results:** The positive control (H_2O_2) presented expressive cytotoxicity, cellular death approximately 80% in SGR-JFH1 cells and 95% in Huh-7.5 cells. The compounds presented the tendency to induction of early apoptosis by the treatments with NBCs in the Huh-7.5 cells and in the SGR-JFH1 for the concentrations tested. There was no influence of the treatments with the NBCs under the necrosis pattern in the Huh-7.5 cells and in the SGR-JFH1 for the concentrations tested. There was also a reduction of intracellular viral load as effects of treatments with RVT, F-RVT and TAU in 1 day in treatments and absence of influence on extracellular viral load in the same period. **Conclusion:** The compounds studied had an effect on the induction of apoptosis Precose in Huh-7.5 cells and SGR-JFH1 cells and on the reduction of intracellular viral load of HCV.

Palavras-Chave: VHC, Hepatite C, estresse oxidativo e apoptose.

Lista de abreviaturas e sigla

CCL-5	Ligante do Receptor de Quimiocina 5
CNBs	Compostos Naturais Bioativos
ERONs	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
F-RVT	F-Resveratrol
IL-8	Interleucina 8
HCC	Carcinoma Hepatocelular
Huh-7.5	Provenientes de Hepatocarcinoma Humano
PPAR	Proliferadores de Peroxisoma
OMS	Organização Mundial da Saúde
NO	Óxido Nítrico
SREBP	Proteína Reguladora do Elemento Regulador do Esterol
RVT	Resveratrol
TAU	taurina
VHC	Vírus da Hepatite C

Lista tabelas e quadros

Introdução.

Quadro 1. Combinações medicamentosas preconizadas para o tratamento da Hepatite C no Brasil.	21
--	----

Capítulo 1.

Table 1. Natural bioactive compounds (NBCs) with biological or anti-hepatitis C virus activities.	44
---	----

Capítulo 2.

Table 1. Summary of signaling pathways involved in hepatic lipid processing and resulting metabolic effects.	65
--	----

Capítulo 3.

Tabela 1. Concentrações inibitórias médias de resveratrol e f-resveratrol para as linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.	93
---	----

Capítulo 4.

Tabela 1. Concentrações inibitórias médias de taurina para as linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.	114
---	-----

Lista de figuras

Introdução

Figura 1. Esquema visual do ciclo de replicação do Vírus da Hepatite	18
Figura 2. Estrutura molecular do resveratrol.	23
Figura 3. Estrutura molecular do f-resveratrol.	24
Figura 4. Estrutura molecular da taurina.	25

Capítulo 1.

Figura 1. Viral and host chronicity factors involved in hepatitis C progression.	34
--	----

Capítulo 2.

Figura 1. The role of cell signaling molecules regarding steatosis.	72
Figura 2. Cell signaling pathways involved in lipid metabolism.	76

Capítulo 3.

Figura 1. Viabilidade celular das células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com H ₂ O ₂ 1 mmol L ⁻¹ (CP).	94
Figura 2. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.	95
Figura 3. Análise do índice de apoptose precoce em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com resvetratrol e f-resveratrol.	96
Figura 4. Análise do índice de necrose em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com resveratrol e f-resvaratrol.	97
Figura 5. Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC em sobrenadante de células SGR-JFH1.	98
Figura 6. Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC meio intracelular e no sobrenadante de células SGR-JFH1.	99

Capítulo 4.

Figura 1. Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC meio intracelular e no sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com taurina.	115
Figura 2. Análise do índice de apoptose precoce em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com taurina.	116
Figura 3. Análise do índice de necrose em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com taurina.	117

Sumário

Introdução.	14
Capítulos	27
Capítulo 1. Natural Bioactive Compounds As Adjuvant Therapy For Hepatitis C Infection.	28
Abstract	29
Graphical Abstract	29
Introduction	30
Methods	35
Results and discussion	35
Conclusion	46
Funding	46
References	46
Capítulo 2. Central cellular signaling pathways involved with the regulation of lipid metabolism in the liver: a review.	62
Abstract	63
Introduction	63
Methods	64
Lipids and cell signaling pathways	65
Conclusion	77
Acknowledgements	77
References	77
Capítulo 3. Efeito do resveratrol e derivado sobre a morte celular e replicação do Vírus da Hepatite C.	83
Resumo	84
Introdução	84
Metodos	84
Resultados	93
Discussão	100
Conclusão	102
Referências	102
Capítulo 4. Avaliação do potencial antioxidante da taurina sob a modulação da morte celular e replicação do vírus da hepatite C.	106
Resumo	107
Introdução	108
Metodos	108
Resultados	114
Discussão	118
Conclusão	119
Referências	119
Considerações Finais	120

Introdução

Hepatites virais: breve histórico

A história das hepatites virais remonta vários milênios. Existem relatos de ocorrência de icterícia entre na população chinesa há mais de cinco mil anos. Além disso, a descrição de casos de icterícia de origem infecciosa relacionada a problemas hepáticos foi descrita por Hipócrates. No entanto, somente no século XVIII introduziu-se o termo hepatite para designação da sintomatologia destas doenças (REUBEN, 2002).

A observação da sintomatologia e vias de transmissão das hepatites foi foco de interesse da ciência por anos, e sabe-se que a suspeita da transmissão destas por via parenteral foi descrita pela primeira vez em 1895, devido ao desenvolvimento de quadro de icterícia em 14,8% dos indivíduos vacinados contra a varíola por meio de vacina produzida a partir de linfa humana. A sintomatologia da doença manifestou-se de dois meses a oito meses após a aplicação da vacina, caracterizando-se por fadiga, anorexia, queixas digestivas, icterícia e por intenso prurido cutâneo. No entanto, o estabelecimento da transmissão das hepatites por inoculação parenteral, ocorreu apenas em 1937, com a ocorrência de casos de icterícia sintomáticos de dois a sete meses após a inoculação de vacina contra febre amarela preparada com adição de soro humano para fins de estabilização (REUBEN, 2002; ALTER, 2003).

A ocorrência de quadro de icterícia a partir de outras vias de contaminação (via fecal-oral, através de água ou alimentos contaminados), com período de incubação mais curto (sete a 10 dias exposição) também foram descritas ao longo dos anos, corroborando com a hipótese de que a sintomatologia das hepatites variava de acordo com diferentes agentes etiológicos (REUBEN, 2002; ALTER, 2003).

Dessa forma, esforços passaram a ser dispendidos no sentido de isolar os agentes infecciosos das hepatites. O vírus da hepatite B foi o primeiro a ser descoberto (BLUMBERG et al., 1965). Posteriormente o vírus da hepatite A foi isolado (FEINSTONE et al., 1973) e em 1989, a partir de estudos de biologia molecular, identificou-se o genoma do agente viral

responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não-A e não-B16. Tal agente foi denominado de vírus da hepatite C. (CHOO et al., 1989).

Relêvancia epidemiológica e formas de infecção da hepatite C

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 71 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus da hepatite C (VHC) mundialmente, e que o número de mortes relacionadas a essa infecção alcance 400 mil pessoas por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Os dados epidemiológicos no Brasil para hepatites virais são escassos e muitas vezes divergentes, pois apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória, o sistema informacional conta como principal fonte notificadora os bancos de sangue e hemocentros que estão situados em áreas geográficas restritas, o que dificulta a estimativa precisa para a população geral (CARVALHO et al., 2014; MARTINS et al., 2010). No entanto, estima-se que cerca de 700 mil indivíduos são sorreagentes anti-VHC no Brasil (BENZAKEN et al., 2018).

As principais formas de infecção com o VHC são a transfusão de sangue de indivíduos infectados, o compartilhamento de material para uso de drogas (seringas, agulhas, cachimbos, entre outros) e de higiene pessoal (lâminas de barbear e depilar, escovas de dente, alicates de unha ou outros objetos perfurocortantes), a confecção de tatuagem ou colocação de piercings com objetos contaminados, a transmissão vertical (transferência do vírus da mãe infectada para o filho durante a gestação e/ou parto) e sexo sem camisinha com indivíduo infectado (forma mais rara de infecção) (MARTINS et al., 2010).

A infecção pelo VHC pode ser aguda ou crônica. A hepatite C aguda geralmente é assintomática e progride para a cura espontânea em 15 a 45% dos casos. No entanto, existem casos de persistência da infecção e de evolução para hepatite C crônica (55 a 85% dos casos). Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo VHC não foram ainda completamente elucidados, mas, sabe-se que o dano hepático produzido na

cronicidade dessa doença pode ocasionar fibrose hepática, cirrose, falência hepática e/ou carcinoma hepatocelular (HCC) (BURKE & COX, 2010). Assim, a infecção pelo VHC constitui-se como a principal causa de hepatopatias crônicas (60%) e maior causa de indicação de transplante de fígado no mundo, visto que, de 5 a 20% dos indivíduos infectados pelo vírus desenvolvem cirrose em até 30 anos da infecção. Além disso, de 1 a 5% indivíduos infectados falecem em decorrência da doença, por cirrose ou em decorrência do HCC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Heterogeneidade genética e ciclo do VHC

O VHC pertence à família Flaviviridae (gênero Hepacivirus) e é constituído por RNA com genoma fita simples de polaridade positiva. O RNA viral codifica uma extensa poliproteína, composta por aproximadamente 3.000 aminoácidos, que distingue-se em proteínas estruturais, o capsídeo (core) e as glicoproteínas de envelope E1 e E2, e em proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) que são responsáveis pela replicação viral (CHAMPEIMONT et al., 2016; DUBUISSON & COSSET, 2014).

O processo de replicação viral do VHC ocorre nos hepatócitos e permite a caracterização de 6 genótipos e 67 subtipos (identificados por letras minúsculas segundo ordem de descoberta) desse vírus, no entanto, durante o processo de replicação pode ocorrer variações na inclusão de nucleotídeos dentro de um mesmo genótipo e subtipo do VHC. Tais variações, denominadas *quasispecies*, ocorrem devido à replicação imperfeita do vírus e do surgimento de pequenas e constantes mutações espontâneas durante a replicação viral e contribuem para a absorvância grande diversidade e variabilidade gênica do VHC (MESSINA et al., 2015; SMITH et al., 2014).

A entrada do VHC na célula é um processo altamente orquestrado, que envolve fatores virais e da célula hospedeira. A primeira etapa do ciclo de vida do vírus é a ligação da partícula viral à célula hospedeira, para a

qual há uma interação específica entre receptores na superfície da célula hospedeira (Glicosaminoglicanos, Receptores Lipoproteína de Baixa Densidade, Tetraspanina - CD81, Scavenger Receptor – SR-BI, Claudin – CLDN e Occludin - OCLN) e glicoproteínas virais de adesão (E1 e E2 do envelope) que induz a endocitose e entrada de partículas de VHC através da membrana plasmática celular (WHIDBY et al., 2009).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, há a liberação do RNA viral fita simples positiva no citoplasma. A fita de RNA positiva é replicada em fita negativa que é usada para a síntese de outras fitas positivas por intermediário replicativo. Assim, este genoma pode ser empregado em tradução de novas proteínas do vírus, replicação de maiores quantidades de RNA e montagem de novas partículas virais infecciosas (BARTENSCHLAGER et al., 2010; LINDENBACH & RICE, 2013). A figura 1 apresenta o esquema visual do ciclo de replicação do VHC.

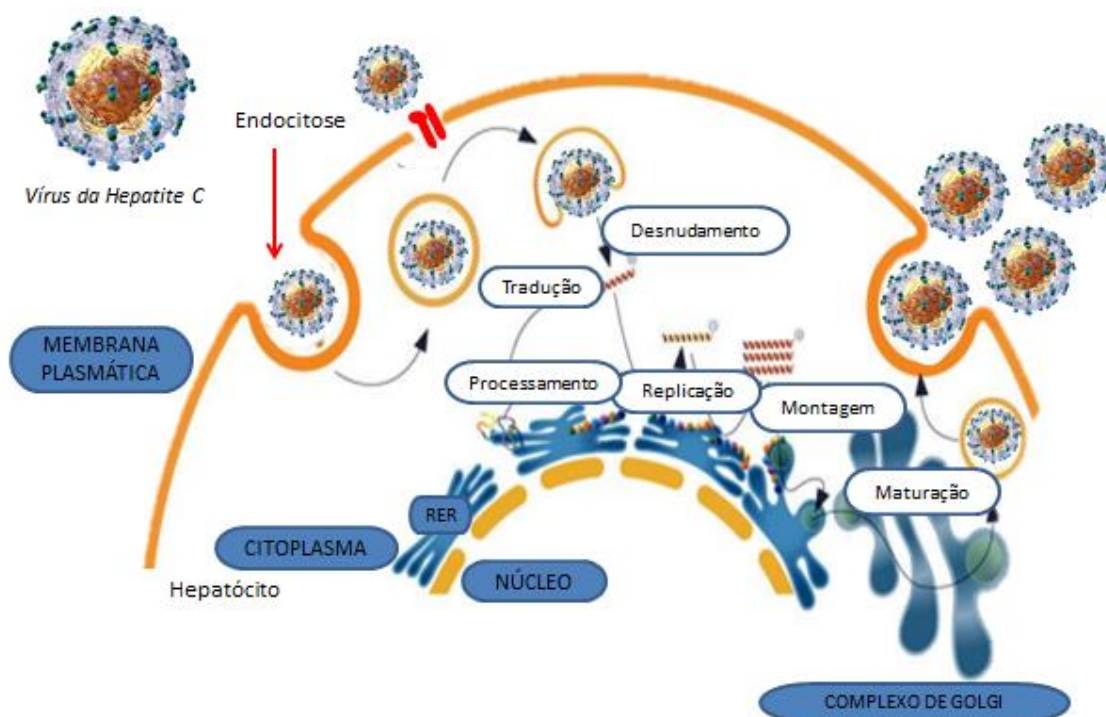


Figura 1. Esquema visual do ciclo de replicação do Vírus da Hepatite C.

Legenda: Partículas virais ligam-se ao hepatócito por meio de interação específica entre as glicoproteínas do envelope e os receptores da membrana celular. As partículas virais são interiorizadas por meio de endocitose. No citoplasma ocorre liberação do genoma viral após

o desnudamento da partícula. A tradução ocorre no RER (retículo endoplasmático rugoso), assim uma lipoproteína é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas não estruturais participam da replicação viral e as estruturais fazem parte da estrutura do capsídeo e compõem as glicoproteínas do envelope. Ocorre então a montagem e a maturação das partículas virais e posteriormente a liberação destas da célula hospedeira.

Fonte: Oliveira, 2007, com adaptações.

O ciclo de vida do VHC está intimamente relacionado ao metabolismo lipídico desde os processos de entrada e replicação viral até a montagem e liberação das partículas infecciosas. Assim, os processos relacionados com o aumento da lipogênese, da redução da degradação de lipídios no fígado e da redução da exportação desses metabólitos do tecido hepático para o organismo podem ser desencadeados pelo VHC, com o objetivo de aumentar a disponibilidade de constituintes necessários à sua replicação e montagem (CHANG, 2016). Alguns autores destacam que a inibição da proteína reguladora do elemento regulador do esterol (SREBP), da enzima ácido graxo sintase, da síntese de triacilglicerídeos e da síntese de colesterol e de seus produtos (geranilgeranil) inibem a replicação do VHC (XIANG et al., 2015; SYED et al., 2011).

A redução da degradação de lipídios no fígado pelo VHC relaciona-se com a redução da via de β -oxidação de ácidos graxos na mitocondria, induzida pelo vírus, o que resulta em baixa combustão lipídica e a inibição da atividade da proteína trifuncional mitocondrial (AMAKO et al., 2015). Além disso, a proteína de core do VHC tem o potencial de aumentar a atividade de receptores ativados por proliferadores de peroxisoma (PPAR), acentuando a desregulação na β -oxidação lipídica e a deposição de gordura no tecido hepático (CHANG, 2016).

As partículas virais infecciosas, depois de formadas, são liberadas causando danos ao tecido hepático resultante de processo inflamatório caracterizado por um infiltrado inflamatório com diferentes populações de células imunes (WHIDBY et al., 2009). O processo inflamatório e os mecanismos da doença no tecido hepático, na hepatite C, ainda não estão bem definidos, mas sugere-se que exista a liberação de citocinas quimiotáticas pelas células endoteliais. Essas citocinas, entre as quais

destacam-se a Interleucina 8 (IL-8) ou ligante 8 da quimiocina e o ligante do receptor de quimiocina 5 (CCL-5), pelo grande potencial quimiotraente de neutrófilos e super expressão na infecção crônica pelo VHC, recrutam linfócitos específicos para o fígado e aumentam a inflamação através das interações entre as células endoteliais e os leucócitos (FIERRO et al., 2015).

O processo inflamatório na hepatite C pode ainda sofrer influência da liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. O NO é um importante mediador pleiotrópico da inflamação e pode levar o tecido a uma lesão inflamatória potencial agravada pela liberação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), os quais aumentam ainda mais a expressão de citocinas (ex. IL-8 e CCL-5) e moléculas de adesão endotelial, amplificando a cascata de inflamação e gerando o estresse oxidativo ao tecido hepático. Assim, o estresse oxidativo (marcado por um aumento de oxidantes e uma diminuição da capacidade antioxidante das células) surge como importante mecanismo bioquímico envolvido na patogênese hepática induzida pelo VHC, uma vez que o equilíbrio entre a geração de ERONs e das defesas antioxidantes é fundamental para a homeostase do hepatócito e um desequilíbrio entre esses agentes pode gerar dano aos hepatócitos, endotélio, células de Kupffer e células estreladas levando à inflamação, isquemia, apoptose, necrose e dano ao DNA, com consequente desenvolvimento do HCC (CAPONE et al., 2012; DIESEN & KUO, 2010; MING-JU, et al., 2011).

O desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante, com predomínio da ação oxidante, promove também alterações na peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é definida como uma reação de oxirredução em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares. Essa reação altera a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas celulares e está associada com a formação de produtos citotóxicos e morte celular (FRANÇA et al., 2013).

Tratamento antiviral e mecanismos de ação

No Brasil, a lista de medicamentos disponíveis para hepatite C foi ampliada nos últimos anos em decorrência dos avanços no tratamento dessa infecção, destacando atualmente as diferentes combinações terapêuticas antivirais com ação direta sobre a replicação viral para diferentes subtipos do VHC (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2019). Dessa forma, as alternativas terapêuticas para o tratamento da hepatite C, com registro no Brasil e incorporadas ao Sistema Único de Saúde (SUS), apresentam efetividade terapêutica mensurada pela resposta virológica sustentada.

A resposta virológica sustentada pode então ser comparada entre os esquemas propostos em casos de situações clínicas semelhantes, permitindo a análise da oferta dos esquemas terapêuticos no SUS baseada na observação da relação custo-minimização, ou seja, priorização das alternativas que implicam um menor impacto financeiro ao sistema, sem deixar de garantir o acesso a terapias seguras e eficazes às pessoas com hepatite C. Esta estratégia permite a ampliação do acesso ao tratamento medicamentoso a todos os pacientes infectados pelo VHC (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2019).

Entre os medicamentos de uso isolado disponíveis no país podemos citar o daclatasvir, um inibidor do complexo enzimático ns5a, o simeprevir, que apresenta ação inibitória de protease NS3/4A e o sofosbuvir, um análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase do VHC. As combinações medicamentosas preconizadas para o tratamento da Hepatite C, os mecanismos de ação dos fármacos e os efeitos adversos potenciais que estas combinações apresentam estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 2. Combinações medicamentosas preconizadas para o tratamento da Hepatite C no Brasil.

Medicamento	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos
Ombitasvir	Inibidor do complexo enzimático NS5A	
Odasabuvir	Inibidor não nucleosídico da polimerase NS5B	Insônia, náusea, prurido na pele, astenia, fadiga e anemia.

Veruprevir	Inibidor de protease NS3/4 ^a	
Ritonavir	Potencializador farmacocinético	
Ledipasvir	Inibidor do complexo enzimático NS5A	Náusea, diarreia, constipação, dispepsia, vômito, dor abdominal, dor abdominal superior, boca seca, fadiga, irritabilidade, astenia, diminuição do apetite, mialgia, cefaleia, tontura, distúrbios da atenção, problemas de memória, insônia, ansiedade, depressão, distúrbios do sono, prurido e angioedema.
Osofosbuvir	Análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase do VHC	
Elbasvi	Inibidor do complexo enzimático NS5A	Náusea, dor abdominal, dor no abdômen superior, constipação, diarreia, boca seca, vômito, astenia, redução do apetite, artralgia, fadiga, cefaleias, mialgia, tontura, ansiedade, depressão, insônia, irritabilidade, alopecia e prurido.
Grazoprevir	Inibidor de protease NS3/4 ^a	

Fonte: Ministério de Saúde, 2019.

Nota-se, que apesar dos avanços no tratamento da hepatite C, nos últimos anos, os medicamentos disponíveis possuem tolerância relativa, apresentando uma ampla gama de efeitos adversos severos e eficácia variável, de acordo com os diferentes genótipos virais envolvidos na infecção (BUTT et al., 2016; KUMTHIP & MANEEKARN, 2015; LIU et al., 2016).

Assim, diante da gravidade de hepatite C e do grande impacto dessa infecção à saúde pública, diversas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de conhecer os processos metabólicos relacionados à patogênese da hepatite C e de desenvolver produtos que possam exercer atividade no processo inflamatório (diretamente relacionado à doença induzida pelo VHC) apresentando alta eficiência, boa tolerância pelo organismo dos portadores dessa doença e resistência aos mecanismos de evasão por mutabilidade do vírus.

Compostos naturais bioativos

Nesse cenário, destaca-se o esforço aplicado no desenvolvimento de compostos naturais bioativos (CNBs), na forma de coadjuvantes terapêuticos, de forma a atuar sinergicamente com os tratamentos já estabelecidos, interferindo direta ou indiretamente em diferentes etapas da

inflamação para potencializar os resultados terapêuticos. Os CNBs podem ser definidos como uma classe de produtos naturais (puros ou misturados) derivados de alimentos que apresentam benefícios contra doenças, e podem ser alimentos funcionais, suplementos dietéticos, nutrientes isolados, produtos fitoterápicos ou alimentos processados (SILVA et al., 2015; LOVELACE & POLYAK, 2015).

Entre os CNBs vale destacar o resveratrol (RVT), um polifenol natural com estrutura de estilbeno e peso molecular de 228,25g/mol (Figura 2). Este composto apresenta baixa estabilidade frente à oxidação, fotossensibilidade e a solubilidade aquosa reduzida, no entanto, possui efeito biológico amplo, apresentando efeitos anit-envelhecimento (promoção de longevidade e atenuação contra doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer), atividades antimutagênica/antitumorais, anticarcinogênica, antiagregante plaquetária, anti-inflamatórias, antioxidantes e antivirais, além de um importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares (GAMBINI et al., 2015; KULKARNI & CANTÓ, 2015).

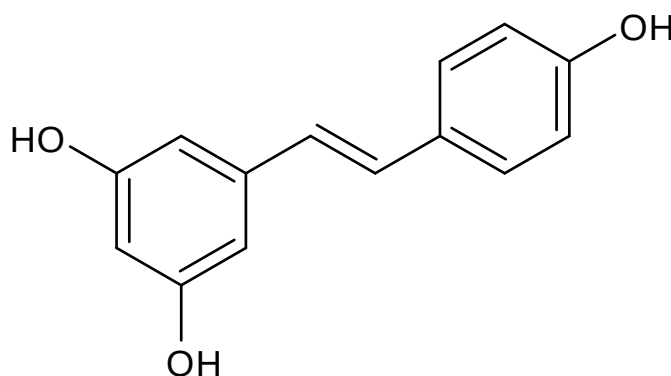


Figura 2. Estrutura molecular do Resveratrol.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade biológica do RVT está relacionada à inibição da COX, e consequente promoção de efeitos de quimioprotetores para prevenção do câncer, redução do estresse oxidativo e regulação de mediadores inflamatórios. A inibição da ciclooxigenase também suprime o NF-κB e inibe a replicação viral, pela redução da expressão gênica e da síntese de proteínas virais. Descata-se ainda o potencial de regulação de angiogênese do RVT e

possível relação deste potencial com a prevenção de câncer (GAMBINI et al., 2015; KULKARNI & CANTÓ, 2015).

A inibição da formação da placa de ateroma, por sua vez, associa-se a atuação do RVT pela melhora que este composto produz no perfil lipídico e na função cardíaca, na modulação da inflamação (redução da produção de várias citocinas angiogênicas, incluindo IL-8) e no aumento da produção de óxido nítrico endotelial com consequente vasodilatação e efeito cardioprotetor, além disso, o RVT também regula positivamente o nível da glicose e o metabolismo do tecido adiposo (KULKARNI & CANTÓ, 2015; ABBA et al., 2015).

Especificamente em relação à atividade do RVT na terapia contra VHC, os resultados são considerados ser inconsistentes, uma vez que, existem evidências indicando efeito inibidor do RVT na replicação viral pela supressão da expressão da proteína NS3 (LEE et al, 2016) e descrição de atividade do RVT no aumento da replicação do VHC (CARREÑO, 2014).

Considerando a grande atividade biológica do RVT como agente oxidante e o potencial deste para síntese de derivados diversos. Torna-se oportuno citar o desenvolvimento de um composto derivado do RVT a partir da adição da molécula de flúor. Este composto com peso molecular de 299,13 g/mol, denominado f-resveratrol (F-RVT), foi desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara, sob a coordenação do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos e da Profa. Dra. Chung Man Chin. A estrutura molecular do F-Resveratrol pode ser observada na figura 3.

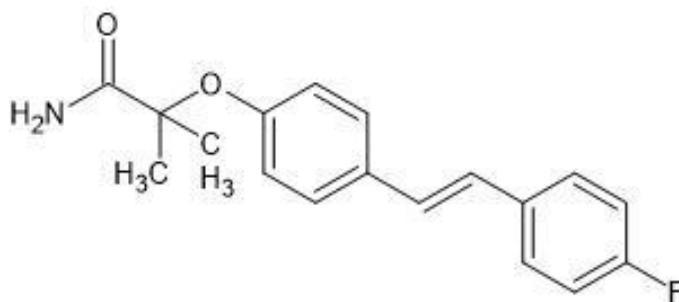


Figura 3. Estrutura molecular do f-resveratrol.

Fonte: Elaborado pelo autor, a partir de informações do laboratório desenvolvedor.

Apesar de não ter sua atividade biológica completamente elucidada, acredita-se no efeito potencial do F-RVT sobre o VHC por sua capacidade antioxidante e efeito sobre PPAR.

A taurina (TAU) ou ácido 2-aminoetanossulfônico é aminoácido condicionalmente essencial que contém enxofre e deriva-se dos aminoácidos cisteína e metionina. Este composto, de peso molecular de 125,15 g/mol, difere-se dos demais aminoácidos pela presença de um grupo sulfônico (-SO₃) ao invés do grupo carboxílico (COOH) (IKUBO et al., 2011).

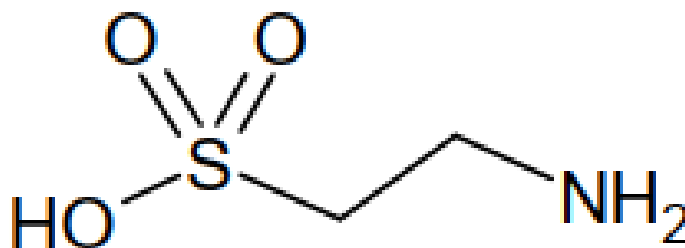


Figura 4. Estrutura molecular da taurina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A TAU não participa da síntese proteica, no entanto, constitui-se como um dos aminoácidos mais abundantes do organismo humano, destacando-se pelo desempenho de funções fisiológicas importantes no metabolismo energético, no sistema nervoso central e na retina, nos músculos esqueléticos e nos ossos (modulação de cálcio), no coração e nos intestinos. Além disso, o composto apresenta ação sobre a estabilidade da membrana plasmática, a reprodução, a imunidade (IKUBO et al., 2011; MENZIE et al., 2014; MURAKAMI, 2015).

Entre efeitos da TAU destaca-se seu potencial antioxidante e anti-inflamatório. Esses efeitos estão relacionados à capacidade da TAU de estabilizar as biomembranas, reduzindo a peroxidação de lipídica das mesmas e eliminando espécies reativas de oxigênio (IKUBO et al., 2011). A

TAU apresenta também efeitos de neuromodulação, neuroproteção e modulação do metabolismo da glicose (MENZIE et al., 2014; MURAKAMI, 2015).

Diante do potencial destes CNBs faz-se necessário desvendar e caracterizar detalhadamente os possíveis mecanismos de ação de tais CNBs como inibidores do ciclo de replicação viral e do processo inflamatório induzido pelo VHC.

Desse modo, propõe-se a realização desse estudo com o objetivo de avaliar e a influência dos CNBs (RVT, F-RVT e TAU) sobre o estresse oxidativo em células provenientes de hepatocarcinoma humano (Huh-7.5), transfectadas ou não com o replicon subclone genômico do vírus da hepatite C, SGR-JFH1 (Japanese fulminant hepatitis-1, genótipo 2a). Para tanto, buscou-se i) determinar o perfil de citotoxicidade in vitro induzido pelos CNBs nas células Huh-7,5 e SGR-JFH1, ii) avaliar o potencial de inibição da carga viral induzidos pelos compostos bioativos e iii) avaliar o potencial de indução de apoptose e necrose dos CNBs nas células Huh-7,5 e SGR-JFH1 por citometria de fluxo.

Esse trabalho será apresentado em quatro capítulos. Os dois primeiros capítulos são artigos de revisão, sendo o primeiro relacionado à utilização CNBs como possibilidade de adjuvantes terapêuticos na infecção por hepatite C e o segundo relacionado às vias de sinalização celular envolvidas na regulação do metabolismo lipídico no fígado. Os dois últimos artigos, por sua vez, buscam responder aos objetivos do trabalho (descritos no parágrafo anterior). Deste modo buscou-se sistematizar a pesquisa desenvolvida e os resultados encontrados segundo CNB de interesse. Assim, capítulo 3 estará relacionado aos CNBs RVT e F-RVT e o capítulo 4 a TAU. Vale salientar que as normas de formatação de cada um dos capítulos seguem as orientações das revistas para as quais os artigos foram ou serão enviados.

Considerações Finais

Ao conduzir esse trabalho buscamos oferecer aos pesquisadores/profissionais de área da saúde/nutrição e afins dados sistematizados sobre a ação de CNBs sobre a hepatite C, destacando possíveis mecanismos de ação antioxidante, antiviral, antitumoral destes compostos (capítulo 1) e as vias relacionadas ao metabolismo lipídico que podem estabelecer interface com estresse celular, inflamação, esteatose, homeostase de lipídios e glicose, diferenciação celular, resistência à insulina, função hepática e distúrbios metabólicos e complicações resultantes (capítulo 2).

Buscou-se ainda, avaliar os efeitos de CNBs, nomeadamente RVT, F-RVT e TAU, sobre apoptose, proliferação ou viabilidade celular em células Huh-7.5 e células Huh-7.5 expressando SGR JFH1, apresentando compostos com potencial interessante para modificação do perfil de morte celular e a redução de carga viral, na perceptiva intracelular, resultados expressivos com período de incubação de 24 horas, e extracelular, resultados que sugerem a necessidade de ampliação do período de incubação para consolidação dos resultados.

Referências

ABBA, Y. et al. Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. **Adv Virol.** v. 2015, p. 1-7, 2015. doi:10.1155/2015/184241.

ALTER HJ. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. **J Hepatol.** v. 39, p. 149-152, 2003.

AMAKO, Y. et al. Hepatitis C virus attenuates mitochondrial lipid β -oxidation by downregulating mitochondrial trifunctional-protein expression. **J Virol.** v. 89, p. 4092-4101, 2015.

BARTENSCHLAGER, R.; COSSET, F.-L.; LOHMANN, V. Hepatitis C virus replication cycle. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 583–585, 2010.

BENZAKEN, A. et al. Hepatitis C elimination by 2030 is feasible in Brazil: a mathematical modelling approach. *Journal of Hepatology*, [S.l.], v. 68, p. S193, 2018.

BLUMBERG BS, et al. A "new" antigen in leukemia sera. **Jama.** v. 191, p. 541-546, 1965.

BURKE, K.P.; COX, A.L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunol. Res.**, v. 47, n. 1-3, p. 216-227, 2010.

BUTT, A. M. et al. Parallel expression profiling of hepatic and serum microRNA-122 associated with clinical features and treatment responses in chronic hepatitis C patients. **Scientific reports**, v. 6, n. October 2015, p. 21510, 2016.

CAPONE, F. et al. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. **Clin. Biochem.**, v. 45, p. 525–529, 2012.

CARVALHO, J. et al. Método para estimação de prevalência de

hepatites B e C crônicas e cirrose hepática - Brasil, 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 691–700, 2014.

CARREÑO V. Review article: management of chronic hepatitis C in patients with contraindications to anti-viral therapy. **Aliment Pharmacol Ther.** V. 39, n. 2, p. 148-162, 2014. doi:10.1111/apt.12562.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Hepatitis C FAQs for health professionals.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#section1>>.

CHAMPEIMONT, R. et al. Coevolution analysis of Hepatitis C virus genome to identify the structural and functional dependency network of viral proteins. **Scientific reports**, v. 6, n. May, p. 26401, 2016.

CHANG, M. L. Metabolic alterations and hepatitis C: From bench to bedside. **World J Gastroenterol**, v. 22, p. 1461–1476, 2016.

CHOO QL, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. V. 244, p. 359-362, 1989.

DIESEN, D.L.; KUO, P.C. Nitric oxide and redox regulation in the liver. Part I: general considerations and redox biology in hepatitis. **J. Surg. Res.**, v.162, p. 95–109, 2010.

DUBUISSON, J.; COSSET, F.L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - An update. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, Supplement, p. S3–S13, 2014.

FEINSTONE SM, et al. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of virus like antigen associated with acute illness. **Science**, v. 182, p. 1026-1028, 1973.

FRANÇA, B.K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE J Port Gastreterol**, v. 20, n. 5, p.199-206, 2013.

FIERRO, N.A. et al. Spontaneous hepatitis C viral clearance and hepatitis C chronic infection are associated with distinct cytokine profiles in Mexican patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 267–271, 2015.

GAMBINI, J. et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. **Oxid Med Cell Longev**, v. 1, 2015. doi:10.1155/2015/837042.

IKUBO, N. et al. Protective effect of taurine on diabetic rat endothelial dysfunction. **Biomed. Res**, v. 32, n. 3, p.187–193, 2011.

KULKARNI SS, CANTÓ C. The molecular targets of resveratrol. **Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis**, v. 1852, n. 6, p. 1114-1123, 2015. doi:10.1016/j.bbadis.2014.10.005.

KUMTHIP, K.; MANEEKARN, N. The role of HCV proteins on treatment outcomes. **Virology journal**, v. 12, n. 1, p. 217, 2015.

LEE S, YOON KD, LEE M, et al. Identification of a resveratrol tetramer as a potent inhibitor of hepatitis C virus helicase. **Br J Pharmacol**. V, 173, n. 1, p. 191-211. 2016. doi:10.1111/bph.13358.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nat Rev Micro**, v. 11, n. 10, p. 688–700, 2013.

LIU, F. et al. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting

Antivirals in Cell Culture Systems. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 30939, 2016.

LOVELACE, E. S.; POLYAK, S. J. Natural products as tools for defining how cellular metabolism influences cellular immune and inflammatory function during chronic infection. **Viruses**, v. 7, n. 12, p. 6218–6232, 2015.

MARTINS, T. et al. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2010.

MENZIE, J. et al. Taurine and central nervous system disorders. **Amino Acids**, v. 46, n. 1, p. 31–46, 2014.

MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.

MING-JU, H et al. Hepatitis C virus E2 protein induce reactive oxygen species (ROS)-related fibrogenesis in the HSC-T6 hepatic stellate cell line. **J. Cell. Biochem**, v. 112, n. 1, p. 233-243, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília, 2019.

MURAKAMI S. Role of taurine in the pathogenesis of obesity. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 59, n. 7, p. 1353–1363, 2015.

REUBEN A. Landmarks in hepatology: the thin red line. **Hepatol**, v. 36, p. 770-773, 2002

SILVA, T. M. DA et al. Encapsulação de compostos bioativos por coacervação complexa Encapsulation of bioactive compounds by complex coacervation. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 56–64, 2015.

SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014.

SYED, G.H.; SIDDIQUI, A. Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 54, p. 1936-1946, 2011.

WHIDBY, J. et al. Blocking hepatitis C virus infection with recombinant form of envelope protein 2 ectodomain. **J. Virol.**, v. 83, n. 21, p. 11078-11089, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Hepatitis C [On-line]. Atualizado 18 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 30 dez. 2018.

XIANG, Y. et al.. Identification of Cholesterol 25-Hydroxylase as a Novel Host Restriction Factor and a Part of the Primary Innate Immune Responses against Hepatitis C Virus Infection. **J Virol.**, v. 89, p. 6805-6816, 2015.