

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. Resvetrol (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.

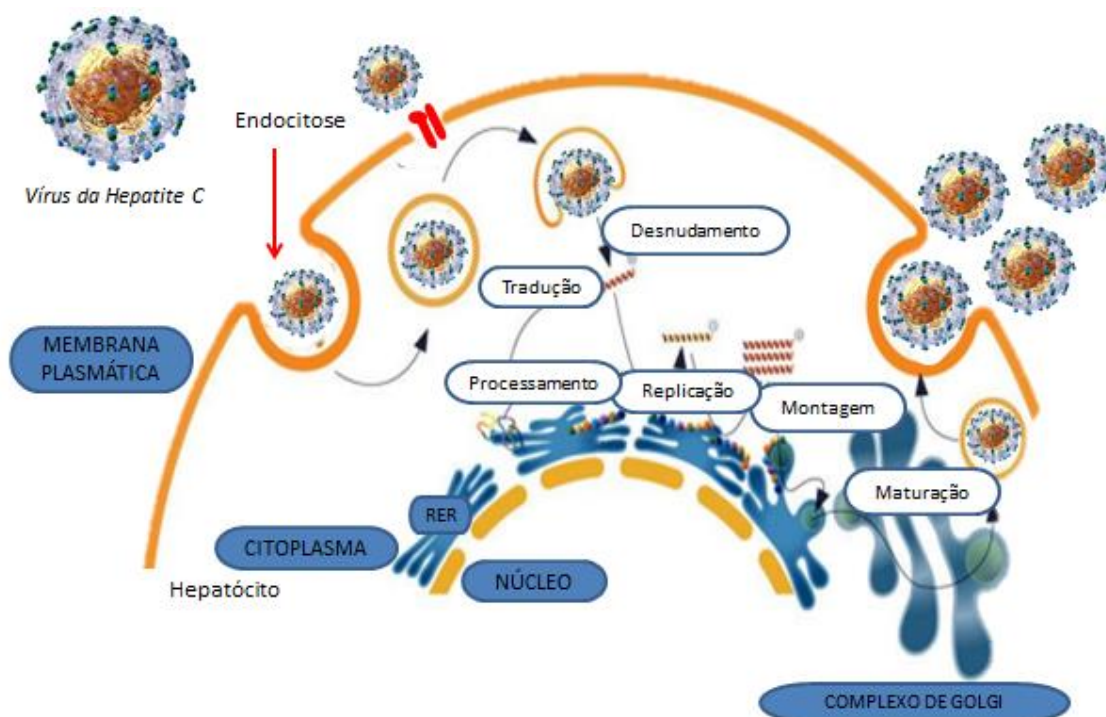


Figura 1. Esquema visual do ciclo de replicação do Vírus da Hepatite C.

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).

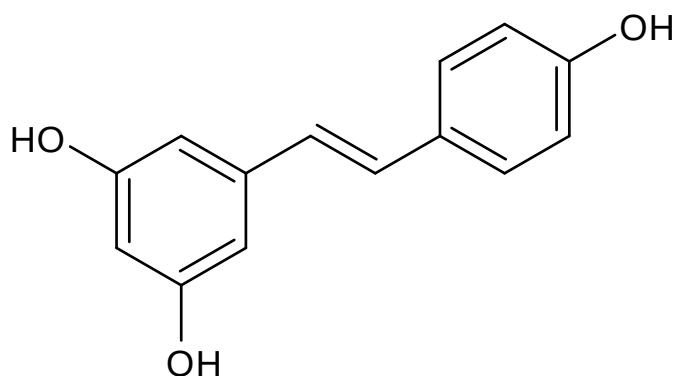


Figura 2. Estrutura molecular do Resveratrol.

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.

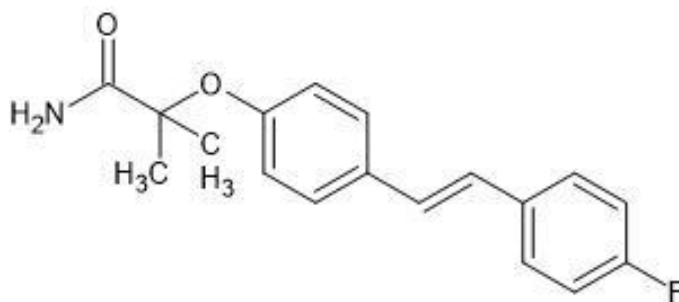


Figura 3. Estrutura molecular do f-resveratrol.

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).

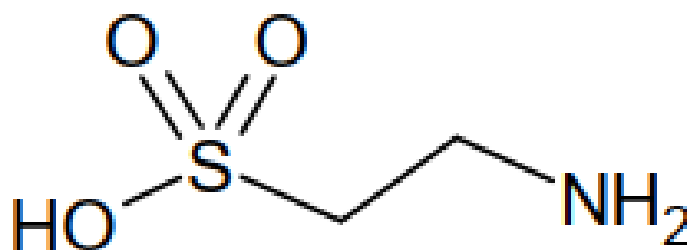


Figura 4. Estrutura molecular da taurina.

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.

Capítulos

Capítulo 1.

Natural Bioactive Compounds As Adjuvant Therapy For Hepatitis

C Infection

Publicação em 8 de outubro de 2020

Current Nutrition and Food Sciences (ISSN: 2212-3881; QUALIS/CAPES -

CIÊNCIAS ALIMENTOS: B1).

Natural Bioactive Compounds As Adjuvant Therapy For Hepatitis C

Infection

Moema S. Santana^a, Rute Lopes^b, Isabela H. Peron^a, Carla R. Cruz, Ana M. M. Gaspar^b and Paulo I. Costa^{a*}

^aFood and Nutrition Department, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil

^bDepartment of Biotechnology, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil

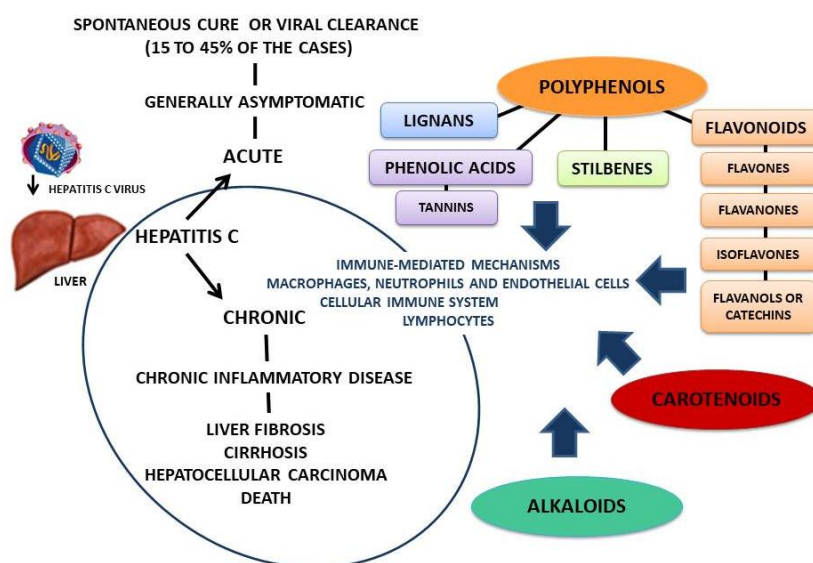
*Author for correspondence. E-mail: costapi.unesp@gmail.com

Abstract

Background: Hepatitis C virus infection is a significant global health liability, which causes acute or chronic hepatitis. Acute hepatitis C is generally asymptomatic and progresses to cure, while persistent infection can progress to chronic liver disease and extrahepatic manifestations. Standard treatment is expensive, poorly tolerated, and has variable sustained virologic responses amongst the different viral genotypes. New therapies involve direct acting antivirals; however, it is also costly and may not be accessible for all patients worldwide. In order to provide a complementary approach to the already existing therapies, natural bioactive compounds have been investigated as to their several biologic activities, such as direct antiviral properties against hepatitis C, and effects on mitigating chronic progression of the disease, which include hepatoprotective, antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory activities. Additionally, these compounds represent advantages, such as chemical diversity, low cost of production and milder or inexistent side effects. **Objective:** To present a broad perspective on hepatitis C infection, chronic disease, and natural compounds with promising anti-HCV activity. **Methods:** This review consists of a systematic review study about the natural bioactive compounds as a potential therapy for hepatitis C infection. **Results:** The quest for natural products has yielded compounds with biologic activity, including viral replication inhibition in vitro, demonstrating antiviral activity against hepatitis C. **Conclusion:** One of the greatest advantages of using natural molecules from plant extracts is the low cost of production, not requiring chemical synthesis, which can lead to less expensive therapies available to low and middle-income countries.

Keywords: Hepatitis C virus, natural bioactive compounds, hepatitis, adjuvant therapy, viral replication, molecular pathways.

Graphical Abstract



1. INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a single-stranded, RNA virus in the Flaviviridae family of about 9.6 kb in length with positive polarity, enveloped in a lipid bilayer, which encodes a single polyprotein of approximately 3,000 amino acids. The RNA genome is composed of a single open reading frame flanked by 5'- and 3'- highly structured untranslated regions. The 5'-untranslated regions contain a type III internal ribosomal entry site that is critical for viral replication. The polyprotein is cleaved by virus and host proteins into three structural proteins, core, the envelope glycoproteins E1 and E2, and seven nonstructural proteins, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, and NS5B[1,2]

Hepatitis C, liver inflammation caused by the hepatitis C virus (HCV), is considered one of the major hepatic diseases due to its worldwide distribution and great impact on public health. HCV may cause acute or chronic infection. Acute infection is usually asymptomatic, and 15 to 45% of people respond spontaneously to cure, or viral clearance, up to 6 months after infection. However, persistent infection may lead to chronic liver disease in 55 to 85% of infected individuals.[3,4] The World Health Organization (WHO) estimates that in 2015 there were 1.75 million newly infected individuals and 71 million living with chronic liver disease, while 399,000 died from end-stage infection, not including the deceased from extrahepatic complications of HCV infection and background mortality from other causes.[5]

Currently there are no HCV vaccines available, therefore prevention is necessary to reduce the burden of HCV infection, which includes HCV screening, management and antiviral therapy to the already infected, and activities to reduce or eliminate HCV transmission due to blood, blood components and plasma derivatives; as a result of high-risk activities, as unsafe administration of drug and unprotected sex with multiple partners; and transfusion of blood in health care settings, or in tattoo and body piercing establishments.[6]

The general goal of hepatitis C treatment is to maintain or improve the patients' quality of life through a safe therapy that promotes a slower progress of liver injury and prevents cirrhosis complications, in order to reduce the risk of evolution to hepatocellular carcinoma.[7] Nevertheless, the standard treatment is frequently poorly tolerated, with severe adverse effects and variable efficacy,[8–10]; hence many types of research analyze natural products that may present antiviral activity against HCV, with good tolerability and high efficacy.

Natural bioactive compounds (NBCs) are natural products derived from foods, dietary supplements, isolated nutrients or phytotherapeutic products that have been extracted from plants and used in medicine since ancient times. NBCs have generated substances with several biologic activities, including antiviral effects on hepatitis B and C, human immunodeficiency virus, herpes simplex virus and influenza virus; hepatoprotective, antioxidant, anticarcinogenic, and anti-inflammatory properties, and many other effects.

The purpose of this article is to address HCV infection, its chronic implications, and discuss NBCs that have been linked to anti-HCV activity, presenting the promising possibilities of the use of NBCs as adjuvant therapeutics of hepatitis C.

1.1. Chronic Development of the Disease

HCV infection is a significant global burden that presents a personal, social and economic impact and can cause both acute and chronic hepatitis. The persistent infection can progress to chronic hepatitis C. Chronic HCV infection causes chronic inflammatory disease, possibly evolving to liver fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and death. Hepatitis C is the leading cause of liver transplantation in the United States and Europe being a chronic liver disease.[4,6,11]

The natural history of hepatitis C is difficult to characterize and it has not been completely elucidated due to inaccurate information about transmission patterns, the incidence of cases in the asymptomatic period,

long development course and individual differences in morbidity. It has been suggested the evolution course of the infection might be related to viral factors, as genotype, HCV RNA serum levels and quasispecies; host factors, as genetic components, age at infection (considering that people over 70 years old present increased rates of fibrosis progression), male gender, obesity, type 2 diabetes, insulin resistance, co-infection with hepatitis B or HIV, immunosuppression; and behavioral factors, as chronic alcoholism.[12] The co-infection with other viruses that present similar course of contamination, like HIV, may characterize a faster progression of the disease, compared to HIV negative patients,[13] in a similar fashion as to what is observed in hepatitis B co-infection.[14]

As for individual aspects of hepatitis C, it is complex to provide a prognosis and determine the outcome of treatment because the progression of the disease is multi-factorial.[12] Considering genotype influence, people infected with genotype 3 exhibit a faster progression to fibrosis and higher risk of developing hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma.[15–17] Also, genotype 3 patients are less responsive to direct acting antivirals treatment when compared to other genotypes.[18]

In respect to quasispecies (spontaneous mutations with nucleotide inclusion variations in the same HCV genotype and subtype), there is a possibility of a heterogeneous ensemble of virus infections that would favor HCV evasion from the host immune system and the establishment of a chronic infection, furthermore influencing the resistance to treatment and making the design of a vaccine more challenging.[19]

Concerning behavioral factors, alcoholic consumption effects on hepatitis C is thus far inconsistent. In some studies, intense alcoholic consumption is related to fibrosis aggravation and the progression of the disease chronicity, suggesting a direct connection between alcohol intake and hepatic lesions.[20,21] Alternatively, other researchers report that moderate alcohol intake by HCV carriers does not increase the risk of progression to serious liver disease[22]; nevertheless it should be noted that there is a debate on the subject of the safe limit of consumption.[21]

It should be emphasized that the hepatic damage in the course of HCV infection is associated with immune-mediated mechanisms. The quality of cellular immune system seems crucial for the elimination or persistence of HCV.[23,24] Therefore, CD4⁺ lymphocytes may present two distinct responses to HCV infection. In the first response, Th1 mediated, the secretion of interleukin (IL)-2 and interferon gamma (IFN- γ) stimulates the antiviral host response. In the second response, Th2 mediated, the synthesis of IL-4 and IL-10 stimulates antibody production and inhibits the Th1 response. In this sense, the imbalance between Th1 and Th2 mediated responses might be responsible for both inability to eliminate the HCV as well as the gravity of the hepatic injury. However, the elements that modulate immune response have not been fully elucidated.[23] When the persistence of the infection is related to the imbalance between Th1 and Th2 responses, an inflammatory infiltrate is formed with distinct immune cell populations.[24] These cells are recruited by chemotactic cytokines released by endothelial cells that mobilize specific lymphocytes to the liver and increase inflammation through interactions between endothelial cells and leukocytes.[23]

The recruited cells (macrophages, neutrophils and endothelial cells), in the attempt to eliminate the virus, produce and release nitric oxide, which is an important pleiotropic mediator of inflammation and may cause a potential inflammatory injury to the tissue, that might be aggravated by the release of reactive oxygen and nitrogen species (RONS). The RONS increase even more the expression of cytokines (IL-8, CCL5) and other endothelial adhesion molecules, amplifying the inflammation cascade and generating oxidative stress to the hepatic tissue. Thus, oxidative stress (featured by an increase of oxidizing agents and diminished antioxidant ability in cells) occurs as an important biochemical mechanism involved with hepatic pathogenesis induced by HCV infection, since the equilibrium between RONS production and antioxidant defenses is crucial to physiological homeostasis, and an imbalance might cause injury to hepatocytes, endothelium, Kupffer cells, and hepatic stellate cells (HSC) This results in inflammation, ischemia, DNA damage, apoptosis and necrosis, which may lead to hepatocellular

carcinoma.[25,26] There is a possibility of direct induction of RONS and mitochondrial dysfunction caused by the virus, since the increase in RONS production and oxidative stress induction by the virus core protein, NS3 and NS5A in vitro and in vivo has been reported.[11] The critical role of host-virus interaction might be demonstrated by the capacity of viral proteins, especially core protein, to trigger an initiation signal of cellular proliferation, differentiation or apoptosis processes.

In the normal liver, HSCs are quiescent, but when activated by cytokines in response to liver injury, HSCs transform proliferative, contractile myofibroblasts, producing other extracellular matrix (ECM) proteins and cytokines in excess and disrupting the balance between deposition and dissolution of ECM proteins. It eventually leads to fibrotic scarring, liver dysfunction, cirrhosis and its complications. HCV proteins modulate signaling and metabolic pathways, promoting an immune response that will cause chronic inflammation.[27,28] Figure 1 displays viral and host chronicity factors involved in hepatitis C progression.

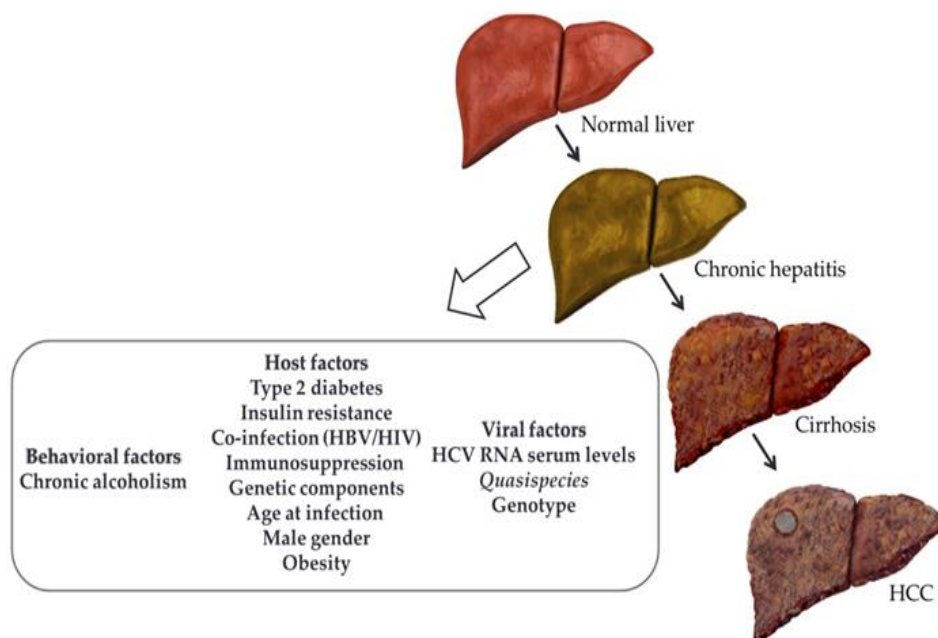


Figure 1. Viral and host chronicity factors involved in hepatitis C progression.

Chronic hepatitis C and the inflammatory response are linked associated with extrahepatic manifestations including type 2 diabetes,

glomerulonephritis, thyroid disorders, porphyria cutaneous tarda, mixed cryoglobulinemia, lichen planus, B-cell non-Hodgkin lymphoma, Sjögren's syndrome, atherosclerosis, cardiovascular and brain disease.[29–31]

2. METHODS

This review consists of a systematic study about the natural bioactive compounds as therapeutic potential for hepatitis C infection. The databases Medline, Scopus and Web of Science were included in the search.

The search was conducted using the descriptors: ("natural bioactive compounds") AND ("hepatitis C"). Studies were restricted to those published from 2014 to 2019 in English language.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. NBCs in hepatitis c treatment

Currently, the standard treatment for hepatitis C consists of pegylated interferon alpha (PEG-IFN- α) with ribavirin, frequently poorly tolerated, thus causing severe side effects which causes discontinuation of the treatment, and it also shows variable efficacy according to viral genotype.[8–10] In the last few years, HCV therapy has been thoroughly improved after many direct acting antivirals were accepted to be used in the clinical practice. This new treatment has shown high sustained virologic response, reduction of both dosage and treatment duration, preferably of oral intake, and with fewer side effects. However, developing a flawless treatment is a challenge. Despite the advances already achieved, drug resistance and genotype specific efficacy are some issues to be considered.[32,33]

Therefore, in view of hepatitis C gravity and the great impact this infection has on public health, several researches have been focusing on the development of potential products, amongst them are NBCs which are complementary therapeutics and in synergy to the already established treatment course, that could present high efficacy, displaying less or no side effects, and that could be resistant to the virus evasion mechanisms by mutagenesis.

NBCs can be defined as a class of natural products, pure compounds or mixtures, derived from foods that present health benefits, dietary supplements, isolated nutrients, phytotherapeutic products or processed foods.[34,35] The WHO estimates approximately 80% of the population worldwide predominantly depend on traditional medicine for their primary health care.[36]

Throughout history, several natural compounds have been extracted from plants and used in medicine. Plants exhibit the ability to produce a wide variety of compounds, responsible for their essential functions related to growth and development. The quest for natural products has yielded compounds with biologic activity, including viral replication inhibition in vitro, with certain natural medicines demonstrating antiviral activity against hepatitis B and C, human immunodeficiency virus, herpes simplex virus and influenza virus. Also, several herbs are known for their hepatoprotective properties.[37] In this way, NBCs are important pharmacologically, being part of the composition of most modern medicines with prophylactic or therapeutic intervention mechanics. [37]

When it comes specifically to hepatitis C, the important role that NBCs can play in reducing infection of new hepatocytes is highlighted, when NBCs act in reducing on viral entry (interactions with specific receptors) and release (formation of lipid drop), reducing viral load, when the mechanisms of action relate with the reduction of viral replication and assembly (influences on viral proteins), and reduction of the inflammatory process and the advancement of the chronicity of the disease through interference of NBCs on virus-host-specific interactions (influence on the production of reactive oxygen and nitrogen species and chemotactic factors).[37,38].

Amidst these compounds, flavonoids, lignans, phytoalexins and tannins should be highlighted.[38] One of the greatest advantages of using natural molecules from plant extracts is the low cost of production, not requiring chemical synthesis, which can lead to less expensive therapies available to low and middle-income countries.

NBCs can be classified into 5 major groups, polyphenols, carotenoids, alkaloids, nitrogen-containing compounds, and organosulfur compounds. The most studied main groups are polyphenols and carotenoids.[39,40]

The focus of this work is the NBCs with activity directly or indirectly linked to hepatitis C therapy.

3.1.1. Polyphenols

Polyphenols have 4 subgroups, corresponding to the number of phenol rings they present: flavonoids, phenolic acids, stilbenes, and lignans. [39,40].

3.1.1.1. Flavonoids

Flavonoids comprise the largest group of natural metabolites with variable phenolic structures observed in vegetables, fruits, grains, bark, roots, stems, flowers, tea, wine and seeds, and they act on the defense against pathogens and insects. The flavonoids are classified into other subgroups: flavones, flavanones, isoflavones, flavanols or catechins, flavanonols, anthocyanins and chalcones. It is reported that some flavonoids have antiviral activity on HCV [37,40].

3.1.1.1.1. Flavones

Flavones constitute a major class in the flavonoids family and their antiviral activity has been known since the 1990's. In flavones, the B ring is attached to C-2.[37,41]

The Asteraceae family, one of the largest angiosperm families with more than 1,000 genera and 30,000 species, has been widely studied for its oral treatment of liver diseases. The compound apigenin, a flavone isolated from the family Asteraceae, has shown activity against RNA viruses, including HCV, reducing mature microRNA miR122, a liver-specific microRNA which positively regulates HCV replication.[37,42,43]

Nobiletin (NOB) is a polymethoxylated flavone found in peels of citrus fruits such as *Citrus depressa* and *C. sinensis* that concomitantly with its

metabolites has displayed numerous physiologic properties, including anti-inflammatory, antiviral, antitumor, anti-dementia, antioxidant, anti-obesity, anti-metabolic syndrome, anti-hyperlipidemia, anti-diabetes, and neuroprotective activities.[44–47]

These effects may be attributed to NOB and its metabolites ability to modulate cellular signaling pathways, mainly related to cyclic adenosine monophosphate (AMPc) and nuclear factor kappa B (NF- κ B).[46,48,49]

NOB supposedly regulates differentiation and lipolysis and improves insulin resistance, apparently directly affecting adipocyte functions[46]. Moreover, it modulates the expression of essential genes for learning and memory by the activation of the AMPc response element-binding protein signaling pathway.[49]

The inhibition of NF- κ B, allows the modulation of the inflammatory process and the response to oxidative stress in a coordinated fashion, whereas NOB and its metabolites may inhibit tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1, mitogen-activated protein kinase (MAPK), LPS-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), and c-Jun N-terminal kinase (JNK), reducing pro-inflammatory signals related to cellular differentiation and apoptosis.[44,48]

Regarding the interaction between NOB, its metabolites and HCV, there is evidence that the antiviral activity is mediated by the inhibition of viral protein NS3.[37] Additionally, a study investigating the inhibitory effect of NOB in vitro, on hepatocarcinoma cells, and in vivo, in mouse model demonstrated a promotion of cell cycle arrest, apoptosis, and regulation of the expression of proteins B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved caspase-3, and cyclooxygenase-2 (COX-2), interfering with apoptosis signaling pathways and the inflammatory process, and significantly reducing tumor growth.[50]

3.1.1.1.2. *Flavanones*

Flavanones constitute a subclass of flavonoids glycosylated by a disaccharide at position 7, and, contrary to other more abundant classes of

flavonoids, flavanones are found almost exclusively in citrus fruits and, in a lower degree, in tomatoes and some aromatic herbs.[51]

Naringenin, a citric flavanone, is a metabolite produced from naringin hydrolysis by enterobacteria. In a research performed by Assini and collaborators[52] in mice fed cholesterol-enriched diets, naringenin attenuated peripheral and systemic inflammation, resulting in protection from atherosclerosis, and also reduced fatty acids synthesis through induction of hepatic fatty acids oxidation, prevented hepatic steatosis, hepatic VLDL overproduction, and hyperlipidemia. The compound apparently presents COX-inhibitory activity potential for the treatment of inflammation, and could traverse the blood–brain barrier for neurodegenerative diseases treatment.[40]

Regarding anti-HCV activity, naringenin inhibits the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) activity, the transcription of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) in infected cells, and reduces HCV secretion in a dose dependent manner without affecting intracellular levels of the viral RNA or protein, by blocking the assembly of intracellular infectious viral particles.[53,54]

3.1.1.1.3. Isoflavones

Isoflavones are simple isomers of flavonoids that display the B ring attached to C-3 of the heterocyclic ring and are naturally found as secondary plant metabolites of the class phytoestrogen.[41]

Curcumin, a curcuminoid phenolic compound that exhibits a bright yellow color, is extracted from *Curcuma longa* L. (turmeric) rhizomes, and has applications as a food ingredient or condiment and in traditional medicine, as a therapeutic adjuvant for the treatment of asthma, dermatitis, Alzheimer's disease, type 1 and 2 diabetes, rheumatoid arthritis, chronic psoriasis vulgaris, fibromyalgia, and many other diseases. This compound displays several properties, as anti-inflammatory, antiviral, antibacterial, antifungal, antioxidant, antiparasitic and antitumor activity.[55–57]

The curcumin plays a role in HCV infection evaluated in studies which aim to elucidate its molecular pathways and its effects over viral replication. [58–60] There are indications that curcumin reduces the intracellular expression of HCV RNA and viral proteins NS5A and NS5B in a dose dependent manner, the activity mediated by the increased expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and the inhibition of the protein phosphorylation of ERK and protein kinase B (AKT). [58] Curcumin also inhibits the expression of NF- κ B in the HCV infected cell; however, studies indicate that the compound activity reduces the HCV RNA expression by the suppression of AKT activation, not by NF- κ B pathway. [58,59]

3.1.1.1.4. *Flavanols or catechins*

Flavanols, flavan-3-ols, dihydroflavonols or catechins are a wide group of polyphenols that are 3-hydroxy derivatives of flavanones. [40]

Epigallocatechin gallate (EGCG) is a polyphenol which is most abundant in green tea extract. This compound presents anti-inflammatory, antitumor, and anti-hepatic steatosis effects, [61–63] and its biologic activity is mainly related to the coordinated action of the metabolic activation pathways of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and the phosphorylation inhibition of AKT, which in turn enables inflammation regulation, blocking the production of inflammatory mediators such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and IL-6, additionally influencing cellular apoptosis. [64]

Concerning the interaction with HCV, there is evidence that the compound interferes with viral cycle by suppressing viral entry into the cell in a dose dependent manner, decreasing RNA replication and obstructing the infectious particle release to the ECM. [65–67] Apparently, binding inhibition between virus and cell surface occurs through the direct action of EGCG over the viral particle, since there is no alteration on expression levels of cellular factors upon HCV entry (CD81, CLDN1, OCLN, SR-BI) when administering the compound. Hence, it is thought that EGCG interacts with envelope glycoproteins E1 and E2, suppressing viral binding to the target cell

surface.[65,66] Research further indicates that EGCG inhibits the expression of viral proteins NS3 and NS5B in in vitro assays, suggesting a relationship between this effect on RNA replication reduction and viral particle release.[67]

3.1.1.2. Phenolic Acids

Phenolic acids may be regarded as promising antiviral candidates, especially caffeic acid and tannins as gallic acid, and their derivatives. [68] Coffee and green tea are rich in caffeine and polyphenols. However, only coffee contains chlorogenic acid in its composition, which, after its absorption, it is metabolized into caffeic and quinic acids. An in vitro study performed by Tanida and collaborators [69] demonstrated that the number of viral particles released by HCV infected cells decreased after treatment with caffeic acid, and NS3 protein levels also decreased. Furthermore, it was also observed that HCV propagation is inhibited when cell treatment with caffeic acid is continuous.

Ajala and collaborators [70] point out the antiviral capacity on HVC of hydrolyzable tannins (ellagic acid and gallic acid) through the inhibitory action of NS3 and NS4A proteases, demonstrating the potential use of these compounds as broadspectrum antivirals.

Liu and collaborators [71] demonstrated that tannic acid, a polymer of gallic acid and glucose, is a potent inhibitor of HCV entry into Huh7.5 cells at low concentrations and blocks the spread of HCV in infectious cell cultures without inhibiting HCV replication after infection. Tannic acid seems to act by preventing the initial anchoring of the HCV virus to the cell surface. In this study, gallic acid, a structural component of tannic acid, did not present anti-HCV activity at a concentration of up to 25 μm . However, the gallic acid and another phenolic compound has been researched for their anti-HCV in vitro properties by Hsu and collaborators [72], and they reported that the compound could inhibit HCV entry into primary human hepatocytes cell culture.

3.1.1.3. Stilbenes

Resveratrol is a natural polyphenol with stilbene structure that demonstrates antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and antiviral activities, apart from an important role in cardiovascular disease prevention.[73,74] The biologic activity of resveratrol is related to COX inhibition, producing effects on cancer prevention, oxidative stress reduction, and regulating inflammatory mediators by suppressing NF- κ B and inhibiting viral replication, with decreased genic expression and viral proteins synthesis. There are pieces of evidence on the potential inhibition of atheroma plaque formation showing improvement of lipid profile and increased production of endothelial nitric oxide with resulting vasodilation and cardioprotective effect. [74,75] Specifically regarding resveratrol's activity on HCV therapy, results may be inconsistent. The evidence indicates viral replication inhibition by the suppression of NS3 protein expression,[76] however, others report an increase in replication. [77]

3.1.1.4. Lignans

Lignans are one of three groups of natural compounds classified as phytoestrogens, due to a diphenolic ring that makes them structurally similar to estrogens. They are isolated from woody portions of plants, seeds and grains, and they act predominantly as antioxidants.[78]

Honokiol is a small active molecular compound extracted from magnolia (*Magnolia officinalis*), a flower used in traditional medicine, belonging to the lignans group.[37] In 2012, Lan and collaborators[79] reported that honokiol displays inhibitory effects on HCV infection in vitro showing promising effects on viral entry into the cell, in genotypes 1a, 1b and 2a, by suppressing the expression of OCLN and SR-BI, which are essential to viral entrance. Moreover, honokiol acted on the replication stage of genotypes 1a and 2a, reducing and even inhibiting, in a dose dependent manner, viral proteins expression, such as NS3, NS5A and NS5B. Finally, honokiol showed more accentuated inhibitory effects on HCV when combined with INF- α than when combined with both ribavirin and INF- α .

3-Hydroxy Caruillignan C (3-HCL-C) is a lignan isolated stems of *Swietenia macrophylla*, and it was described by Wu and collaborators[80] for its anti-HCV properties. This research demonstrated that 3-HCL-C reduced NS3 protein and RNA levels in vitro by the induction of an interferon response pathway (IFN signaling pathway), which is suppressed during HCV infection. Moreover, the combination of 3-HCL-C and IFN- α or telaprevir decreased viral RNA replication.

3.1.2. Carotenoids

Carotenoids are a class of phytonutrients comprising over 600 natural pigments of intense color and high liposolubility, found in fruits, vegetables and some fish.[81] Although they exist in large quantity, there are only a few carotenoids that might be found in human tissues[82] and their anticarcinogenic activity is well documented. [83] These compounds may be employed as cancer biomarkers, since the amount of carotenoids in the organism is inversely proportional to the disease progression.[84]

Lycopene, a carotenoid acyclic found in red grapefruits and in red color vegetables,[85] is known for its antiviral and anticarcinogenic effects.[86] A research by Sheriff [81] evaluated rats with induced hepatitis C, with lycopene, and demonstrated that this compound helps restore hepatic function due to its antioxidant properties. According to Seren and collaborators [86], lycopene molecule structure promotes the inactivation of free radicals and interfere with lipid peroxidation, therefore preventing possible hepatic tissue injuries.

3.1.3. Alkaloids

Alkaloids are a highly diverse group of secondary compounds isolated from plants, less frequently from fungi or animals.

Alkaloid compounds can be classified as true alkaloids, derived from amino acid and a heterocyclic ring with nitrogen; protoalkaloids, when the N atom derived from an amino acid is not a part of the heterocycle; and pseudoalkaloids, in which the basic carbon skeletons are not derived from

amino acids, whereas the definition criteria is based on structure. Alkaloid-containing plants have been used as a medication since early history, including a wide variety of applications, like morphine and codeine as analgesics, hyoscyamine as antispasmodic and anti-parkinson drugs, taxol to treat breast and ovary carcinomas, and many others.[87,88]

Michellamine B, a naturally occurring alkaloid with antioxidant properties, has reduced virus particles that effect cell culture production in persistently infected cells without effecting intracellular RNA levels.[89] Jardim and collaborators[88] reported that APS, a natural alkaloid isolated from *Maytrenus ilicifolia*, had inhibitory effects over HCV replication decreased HCV replication in a dose dependent manner, using subgenomic replicons in vitro. The Myrioneuron alkaloids are a family of lysine-based metabolites synthesized by plants of the genus *Myrioneuron* R. Br. (Rubiaceae) that have a common promising anti-HCV activity, with low cytotoxicity.[91,92]

Different NBCs groups, the main compounds described in this work, and their biological anti-HCV activities are summarized in Table 1.

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

Main group	NBCs	Biologic activity	Effect on HCV	References
Flavonoids	Nobiletin	↓AMPc phosphorylation ↓ stearoyl-CoA enzyme ↓ NF-κB ↓ TNF-α ↓ IL-1 ↓ MAPK, ↓ ERK and JNK phosphorylation	↓ NS3 Hepatocellular carcinoma ↑ Bcl-2 gene ↓ Bax (pro-apoptosis) ↑ Bcl-2 itself (anti-apoptosis) ↓ caspase-3 ↓ COX-2	[38,44-46, 48, 50]
	Naringenin	Anti-inflammatory Prevents atherosclerosis ↓ FA ↓ COX ↓ VLDL production COX-2 ↓ iNOS ↓ JNK ↓ MAPK ↓ NF-κB, ↓ AP-1	↓ MTTP ↓ HMG-CoA ↓ ACAT2 ↓ HCV secretion	[40, 52-54]
	Curcumin	↓ PKC ↓ 5-LOX ↓ IL-6 ↓ IL-8 ↓ IL-1 ↑ Nrf2 ↓ VCAM-1 ↓ AKT	↓ Viral replication ↓ RNA expression ↓ NS5A ↓ NS5B ↑ HO-1 ↓ ERK and AKT phosphorylation	[55–59]

	Nobiletin	↓AMPc phosphorylation ↓ stearoyl-CoA enzyme ↓ NF-κB ↓ TNF-α ↓ IL-1 ↓ MAPK, ↓ ERK and JNK phosphorylation	↓ NS3 Hepatocellular carcinoma ↑ Bcl-2 gene ↓ Bax (pro-apoptosis) ↑ Bcl-2 itself (anti-apoptosis) ↓ caspase-3 ↓ COX-2	[38,44-46, 48, 50]
			↓ Viral entry into the cell	[64–67]
	EGCG	↑ AMPK ↓ AKT ↓ iNOS ↓ IL-6	↓ RNA replication ↓ Viral release reduction ↓ NS3 and NS5B ↓ release of viral particles ↓ NS3	[69]
Phenolic acids	Caffeic acid	-	↓ HCV propagation ↓ NS3 and NS4A	[70,72]
	Gallic acid	-	↓ Viral entry into the cell	
	Ellagic acid	-	↓ NS3 and NS4A	[70]
	Tannic acid	-	↓ Viral entry into the cell	[71]
			Inconsistent information:	[73–77]
Stilbene	Resveratrol	-	↓ Viral replication [74] ↓ NS3 [74] ↑ Viral replication [75]	
Lignans	Honokiol	Antioxidant activity	↓ OCLN and SR-BI ↓ NS3, NS5A and NS5B	[38, 79]
	3-HCL-C		↓ NS3 ↓ RNA levels ↑ IFN signaling pathway	[38,80]
Carotenoids	Lycopene	Antiviral and anticarcinogenic effects	Antioxidant activity: ↓ free radicals and interfere on lipid peroxidation	[81,86]
Alkaloids	Michellamine B, APS, Myrioneuron Family	Antioxidant activity	Anti-HCV activity <i>in vitro</i>	[90-92]

Legend: AMPc: cyclic adenosine monophosphate; NF-κB: nuclear factor kappa B; IL (-6;-8;-1): interleukin; MAPK: mitogen-activated protein kinase; ERK: extracellular signal–regulated kinases; JNK: c-Jun N-terminal kinase; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; Bax: Bcl-2 associated X protein; COX-2: cyclooxygenase-2; FA: fatty acids; MTTP: microsomal triglyceride transfer protein; HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A; ACAT2: acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 enzyme; iNOS: inducible nitric oxide synthase; AP-1: activator protein 1; PKC: protein kinase C; 5-LOX: 5-lipoxygenase; Nrf2: nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2; VCAM-1: vascular cell adhesion protein 1; AKT: Protein

Kinase B; HO-1: heme oxygenase-1; EGCG: epigallocatechin gallate; AMPK: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; OCLN: occluding; SR-BI: scavenger receptor class B member 1; IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; 3-HCL-C: 3-Hydroxy Caruillignan C.

CONCLUSION

Some NBCs compounds have antagonistic effects to HCV due to the ability to modulate cellular signaling pathways, the inflammatory process and the response to oxidative stress in a coordinated fashion, reducing pro-inflammatory signals related to cellular differentiation and apoptosis. In this way, the possibilities of using NCBs as adjuvants in hepatitis C therapy are very promising, but they need to be explored extensively in vivo and later in controlled and randomized clinical trials to define usage techniques and recommended doses to minimize adverse effects and enhance traditional therapy for the treatment of hepatitis C.

FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília - DF, Brazil, Finance Code 001. In addition, it had financial support by CAPES/School of Pharmaceutical Sciences (FCFAR) - São Paulo State University (UNESP)/Scientific Development Support Program (PADC), Araraquara – SP, Brazil, Process: 250 - 10/2017 and São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo – SP, Brazil, Process: 2017/04500-9.

REFERENCES

1. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Micro* 2013; 11(7): 482-96. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3046>.
2. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, Vazquez-Chacon C, Martinez-Guarneros A, Carpio-Pedroza JC,

Fonseca-Coronado S, Cruz-Rivera M. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (43): 15992-16013. doi:10.3748/wjg.v20.i43.15992.

3. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C FAQs for health professionals[Online] 2020[cited 2020]. Available at www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#section1

4. World Health Organization. Hepatitis C (Fact Sheet) [Online] 2019 [cited 2020]. Available at www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/

5. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017 [Online] 2017 [cited 2020]. Available at www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/

6. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, Younossi Z. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Prim* 2017; 3:17006. doi:10.1038 / nrdp.2017.6

7. Sociedade Brasileira de Hepatologia. Consenso sobre Hepatite C Crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia [Online] 2014 [cited 2020]. Available at <https://sbhepatologia.org.br/pdf/consenso-sobre-hepatite-cronica.pdf>

8. Butt AM, Raja AJ, Siddique S, Khan JS, Shahid M, Tayyab G, Minhas Z, Umar M, Idrees M, Tong Y. Parallel expression profiling of hepatic and serum microRNA-122 associated with clinical features and treatment responses in chronic hepatitis C patients. *Sci Rep* 2016; 6:21510. doi:10.1038/srep21510.

9. Kumthip K, Maneekarn N. The role of HCV proteins on treatment outcomes. *Virology* 2015; 12(1): 217. doi:10.1186/s12985-015-0450-x.
10. Liu F, Shimakami T, Murai K, Shirasaki T, Funaki M, Honda M, Murakami S, Yi M, Tang H, Kaneko S. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems. *Sci Rep* 2016;6: 30939. doi:10.1038/srep30939.
11. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci* 2009; 117(2): 49-65. doi:10.1042/CS20080631.
12. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014; 61(1): S58-S68. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012.
13. Gonzalez FA, Van den Eynde E, Perez-Hoyos S, Navarro J, Curran A, Burgos J, Falcó V, Ocaña I, Ribera E, Crespo M. Liver stiffness and aspartate aminotransferase levels predict the risk for liver fibrosis progression in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. *HIV Med* 2015; 16(4): 211-18. doi:10.1111/hiv.12197.
14. Pokorska-Śpiewak M, Kowalik-Mikołajewska B, Aniszewska M, Walewska-Zielecka B, Marczyńska M. The influence of hepatitis B and C virus coinfection on liver histopathology in children. *Eur J Pediatr* 2015; 174(3): 345-53. doi:10.1007/s00431-014-2402-7.
15. De Nicola S, Dongiovanni P, Aghemo A, Cheroni C, D'Ambrosio R, Pedrazzini M, Marabita F, Donnici L, Maggioni M, Fargion S, Colombo M, De Francesco R, Valenti L. Interaction between PNPLA3 I148M variant and age

at infection in determining fibrosis progression in chronic hepatitis C. *PLoS One* 2014; 9(8): e106022. doi:10.1371/journal.pone.0106022.

16. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, Waljee AK. The Effect of PNPLA3 on Fibrosis Progression and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109(3): 325-34. doi:10.1038/ajg.2013.476.

17. Nirei K, Matsumura H, Kumakawa M, Matsumoto N, Nakamura H, Yamagami H, Matsuoka S, Moriyama M. Steatosis influences the clinical profiles and long-term outcomes of interferon-treated chronic hepatitis C and liver cirrhosis patients. *Int J Med Sci* 2017; 14(1): 45-52. doi:10.7150/ijms.17202.

18. Amano R, Yamashita A, Kasai H, Hori T, Miyasato S, Saito S, Yokoe H, Takahashi K, Tanaka T, Otaguro T, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K. Cinnamic acid derivatives inhibit hepatitis C virus replication via the induction of oxidative stress. *Antiviral Res* 2017; 145:123-30. doi:10.1016/j.antiviral.2017.07.018.

19. Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, Moreno P. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol* 2015; 7(6): 831-45. doi:10.4254/wjh.v7.i6.831.

20. Peters MG, Terrault NA. Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1): S220-5. doi:10.1053/jhep.2002.36811.

21. Mueller S, Millonig G, Seitz HK. Alcoholic liver disease and hepatitis C: A frequently underestimated combination. *World J Gastroenterol* 2009; 15(28): 3462-471. doi:10.3748/wjg.15.3462.

22. Vieira-Castro ACM, Oliveira LCM. Impact of alcohol consumption among patients in hepatitis C virus treatment. *Arq Gastroenterol* 2017; 54(3): 232-37. doi:10.1590/s0004-2803.201700000-33.
23. Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, García-Garzón S, Lázaro A, Miquel J, Perna C, Sanz-de-Villalobos E. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20(13): 3418-430. doi:10.3748/wjg.v20.i13.3418.
24. Zheng Z, Sze CW, Keng CT, Al-Haddawi M, Liu M, Tan SY, Kwek HL, Zhisheng H, Chan XY, Barnwal B, Loh E, Chang KTE, Tan TC, Tan Y, Che Q. Hepatitis C virus mediated chronic inflammation and tumorigenesis in the humanised immune system and liver mouse model. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184127. doi:10.1371/journal.pone.0184127.
25. Elsegood CL, Tirnitz-Parker JE, Olynyk JK, Yeoh GC. Immune checkpoint inhibition: prospects for prevention and therapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Immunol* 2017; 6: e161. doi:10.1038/cti.2017.47.
26. Fierro NA, González-Aldaco K, Torres-Valadez R, Trujillo-Trujillo ME, Roman S, Trujillo-Ochoa JL, Panduro A. Spontaneous hepatitis C viral clearance and hepatitis C chronic infection are associated with distinct cytokine profiles in Mexican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110(2): 267-71. doi:10.1590/0074-02760140377.
27. Jee MH, Hong KY, Park JH, Lee JS, Kim HS, Lee SH, Jang SK. New Mechanism of Hepatic Fibrogenesis: Hepatitis C Virus Infection Induces Transforming Growth Factor β 1 Production through Glucose-Regulated Protein 94. *J Virol* 2016; 90(6): 3044-55. doi:10.1128/JVI.02976-15.

28. Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(32): 11033-53. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11033.
29. Taherkhani R, Farshadpour F. Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges. *World J Hepatol* 2017; 9(33): 1239-52. doi:10.4254/wjh.v9.i33.1239.
30. Moriishi K, Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front Microbiol* 2012;3(54):1-14. doi:10.3389/fmicb.2012.00054.
31. Zampino R, Marrone A, Restivo L, Guerrera B, Sellitto A, Rinaldi L, Romano C, Adinolfi LE. Chronic HCV infection and inflammation: Clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J Hepatol* 2013; 5(10): 528-40. doi:10.4254/wjh.v5.i10.528.
32. Popescu C-I, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology* 2014; 3(4): 892-921. doi:10.3390/biology3040892.
33. Scheel TKH, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 2013; 19(7): 837-49. doi:10.1038/nm.3248.
34. Lovelace ES, Polyak SJ. Natural products as tools for defining how cellular metabolism influences cellular immune and inflammatory function during chronic infection. *Viruses* 2015; 7(12): 6218-232. doi:10.3390/v7122933.

35. Silva TM, Rodrigues LZ, Nunes GL, Codevilla CF, Silva CB, Menezes CR. Encapsulação de compostos bioativos por coacervação complexa Encapsulation of bioactive compounds by complex coacervation. *Ciência e Nat.* 2015; 37: 56-64. doi:10.5902/2179-460X19715.
36. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 [Online] 2013 [cited 2020]. Available at apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1
37. Calland N, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K. Hepatitis C Virus and Natural Compounds: a New Antiviral Approach? *Viruses* 2012; 4(10): 2197-217. doi:10.3390/v4102197..
38. Zakaryan H, Arabyan E, Oo A, Zandi K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch Virol* 2017; 162(9): 2539-51. doi:10.1007/s00705-017-3417-y
39. Ramos A, Lima C, Pereira-Wilson C. DNA Damage Protection and Induction of Repair by Dietary Phytochemicals and Cancer Prevention: What Do We Know? In: Chen C, ed. *Selected Topics in DNA Repair*, 1st ed. IntechOpen: London, UK 2011; pp. 238-70. 2011:237-270. doi:10.5772/22125.
40. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 2016; 5(e47):1-15. doi:10.1017/jns.2016.41.
41. Hussain H, Green IR. A patent review of the therapeutic potential of isoflavones (2012-2016). *Expert Opin Ther Pat* 2017; 27(10): 1135-46. doi:10.1080/13543776.2017.1339791.

42. Thompson M, Jaiswal Y, Wang I, Williams L. Hepatotoxicity: Treatment , causes and applications of medicinal plants as therapeutic agents. *J Phytopharm* 2017; 6(3): 186-93.
43. Liu LL, Ha TKQ, Ha W, Oh WK, Yang JL, Shi YP. Sesquiterpenoids with Various Carbocyclic Skeletons from the Flowers of *Chrysanthemum indicum*. *J Nat Prod* 2017; 80(2): 298-307. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00694.
44. Nemoto K, Ikeda A, Yoshida C, Kimura J, Mori J , Fujiwara H , Yokosuka A , Mimaki Y , Ohizumi Y , Degawa M. Characteristics of nobiletin-mediated alteration of gene expression in cultured cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 431(3): 530-34. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.024.
45. Noguchi S, Atsumi H, Iwao Y, Kan T, Itai S. Nobiletin: A citrus flavonoid displaying potent physiological activity. *Acta Crystallogr Sect C Struct Chem* 2016; 72: 124-27. doi:10.1107/S2053229616000577.
46. Lee YS, Cha BY, Choi SS, Choi BK, Yonezawa T, Teruyab T, Nagai K, Woo JT. Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem* 2013; 24(1): 156-62. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.014.
47. Nakajima A, Aoyama Y, Shin EJ, Nam Y, Kim HC, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Yokoi T, Ohizumi Y, Yamada K. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A β levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behav Brain Res* 2015; 289: 69-77. doi:10.1016/j.bbr.2015.04.028.

48. Cui Y, Wu J, Jung SC, Park DB, Maeng YH, Hong JY, Kim SJ, Lee SR, Kim SJ, Kim SJ, Eun SY. Anti-neuroinflammatory Activity of Nobiletin on Suppression of Microglial Activation. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(11): 1814-21. doi:10.1248/bpb.33.1814.
49. Kimura J, Nemoto K, Degawa M, Yokosuka A, Mimaki Y, Shimizu K, Oku N, Ohizumi Y. Upregulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits and c-Fos expressing genes in PC12D cells by nobiletin. *Biol Pharm Bull* 2014; 37(9): 1555-58. doi:10.1248/bpb.b14-00177.
50. Wu YY, Wan LH, Zheng XW, Shao ZJ, Chen J, Chen XJ, Liu LT, Kuang WJ, Tan XS, Zhou LM. Inhibitory effects of β,β -dimethylacrylshikonin on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Phyther Res* 2012; 26(5): 764-71. doi:10.1002/ptr.3623.
51. Li C, Schluesener H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57(3): 613-31. doi:10.1080/10408398.2014.906382.
52. Assini JM, Mulvihill EE, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Felder SL, Chhoker S, Edwards JY, Gros R, Huff1 MW. Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice. *J Lipid Res* 2013; 54(3): 711-24. doi:10.1194/jlr.M032631.
53. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 2008; 47(5): 1437-45. doi:10.1002/hep.22197.

54. Goldwasser J, Cohen PY, Lin W, Kitsberg D, Balaguer P, Polyak SJ, Chung RT, Yarmush ML, Nahmias Y. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J Hepatol* 2011; 55(5): 963-71. doi:10.1016/j.jhep.2011.02.011.
55. Assis RP, Arcaro CA, Gutierrez VO, Oliveira JO, Costa PI, Baviera AM, Brunetti IL. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Int J Mol Sci* 2017; 18(4): E332. doi: 10.3390 / ijms18040332.
56. Konduru AS, Lee B-C, Li J-D. Curcumin suppresses NTHi-induced CXCL5 expression via inhibition of positive IKK β pathway and up-regulation of negative MKP-1 pathway. *Sci Rep* 2016; 6(182): 31695. doi:10.1038/srep31695.
57. Nabavi SF, Daglia M, Moghaddam AH, Habtemariam S, Nabavi SM. Curcumin and liver disease: From chemistry to medicine. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2014; 13(1): 62-77. doi:10.1111/1541-4337.12047.
58. Chen MH, Lee MY, Chuang JJ, Li YZ, Ning ST, Chen JC, Liu YW. Curcumin inhibits HCV replication by induction of heme oxygenase-1 and suppression of AKT. *Int J Mol Med* 2012; 30(5): 1021-28. doi:10.3892/ijmm.2012.1096.
59. Kim KJ, Kim KH, Kim HY, Cho HK, Sakamoto N, Cheong JH. Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-

SREBP-1 pathway. FEBS Lett 2010; 584(4): 707-12.
doi:10.1016/j.febslet.2009.12.019.

60. Shiu TY, Huang SM, Shih YL, Chu HC, Chang WK, Hsieh TY. Hepatitis C Virus Core Protein Down-Regulates p21Waf1/Cip1 and Inhibits Curcumin-Induced Apoptosis through MicroRNA-345 Targeting in Human Hepatoma Cells. PLoS One 2013; 8(4): e61089.
doi:10.1371/journal.pone.0061089.

61. Zhou J, Farah BL, Sinha RA, Wu Y, Singh BK, Bay BH, Yang CS, Yen PM. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), a Green Tea Polyphenol, Stimulates Hepatic Autophagy and Lipid Clearance. PLoS One 2014; 9(1): e87161.
doi:10.1371/journal.pone.0087161.

62. Zeng L, Yan J, Luo L, Ma M, Zhu H. Preparation and characterization of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-loaded nanoparticles and their inhibitory effects on Human breast cancer MCF-7 cells. Sci Rep 2017;7 (45521): 1-15. doi:10.1038/srep45521.

63. Du GJ, Zhang Z, Wen X-D, Yu C, Calway T, Yuan CS, Wang CZ. Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea. Nutrients 2012; 4(11): 1679-91.
doi:10.3390/nu4111679.

64. Pairs A, Dai R, Gan L, Shimp S, Rylander MN, Li L, Reilly CM. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells. Cell Mol Immunol 2010; 7(3): 123-32.
doi:10.1038/cmi.2010.1.

65. Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, Descamps V, Hober D, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2012; 55(3): 720-29. doi:10.1002/hep.24803.
66. Chen C, Qui H, Gong J, Liu Q, Xiao H, Chen XW, Sun BL, Yang RG. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Arch Virol* 2012; 157: 1301-12. Doi:10.1007/s00705-012-1304-0
67. Roh C, Jo SK. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits hepatitis C virus (HCV) viral protein NS5B. *Talanta* 2011; 85(5): 2639-42. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.035.
68. Wu YH, Zhang BY, Qiu LP, Guan RF, Ye ZH, Yu XP. Structure Properties and Mechanisms of Action of Naturally Originated Phenolic Acids and Their Derivatives against Human Viral Infections. *Curr Med Chem* 2017; 24(38): 4279-302. doi:10.2174/0929867324666170815102917.
69. Tanida I, Shirasago Y, Suzuki R, Abe R, Wakita T, Hanada K, Fukasawa M. Inhibitory effects of caffeic acid, a coffee-related organic acid, on the propagation of hepatitis C virus. *Jpn J Infect Dis* 2015; 68(4): 268-75. doi:10.7883/yoken.JJID.2014.309.
70. Ajala OS, Jukov A, Ma CM. Hepatitis C virus inhibitory hydrolysable tannins from the fruits of *Terminalia chebula*. *Fitoterapia* 2014; 117–123. dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.014.
71. Liu S, Chen R, Hagedorn CH. Tannic Acid Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Huh7.5 Cells. *PLoS One* 2015; 10(7): e0131358. 10.1371/journal.pone.0131358.

72. Hsu WC, Chang SP, Lin LC, Li CL, Richardson CD, Lin CC, Lin LT. Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. *Antiviral Res* 2015; 118: 139-147. doi:10.1016/j.antiviral.2015.04.003.
73. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 837042: 1-13. doi:10.1155/2015/837042.
74. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(6): 1114-23. doi:10.1016/j.bbadis.2014.10.005.
75. Abba Y, Hassim H, Hamzah H, Noordin MM. Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. *Adv Virol* 2015; 184241: 1-7. doi:10.1155/2015/184241.
76. Lee S, Yoon KD, Lee M, Cho Y, Choi G, Jang H, Kin BS, Jung DH, Oh JG, Kim GW, Oh JW, Jeong YJ, Kwon HJ, Bae SK, Min DH, Windisch MP, Heo TH, Lee C. Identification of a resveratrol tetramer as a potent inhibitor of hepatitis C virus helicase. *Br J Pharmacol* 2016; 173(1): 191-211. doi:10.1111/bph.13358.
77. Carreño V. Review article: management of chronic hepatitis C in patients with contraindications to anti-viral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39(2): 148-162. doi:10.1111/apt.12562.

78. Webb AL, McCullough ML. Dietary lignans: potential role in cancer prevention. *Nutr Cancer* 2005; 51(2): 117-31. doi:10.1207/s15327914nc5102_1.
79. Lan KH, Wang YW, Lee WP, Lan KL, Tseng SH, Hung LR, Yen SH, Lin HC, Lee SD et al. Multiple effects of Honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver Int* 2012; 32(6): 989-97. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02621.x.
80. Wu SF, Lin CK, Chuang YS, Chang FR, Tseng CK, Wu YC, Lee JC. Anti-hepatitis C virus activity of 3-hydroxy caruillignan C from *Swietenia macrophylla* stems. *J Viral Hepat* 2012; 19(5): 364-370. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01558.x.
81. Sheriff SA, Devaki T. Lycopene stabilizes liver function during d-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatitis in rats. *J Taibah Univ Sci* 2013; 7(1): 8-16. doi:10.1016/j.jtusci.2013.01.002.
82. El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscotta TG, Young AJ. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430(1): 37-48. doi:10.1016/j.abb.2004.03.007.
83. Sharoni Y, Danilenko M, Dubi N, Ben-Dor A, Levy J. Carotenoids and transcription. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430(1): 89-96. doi:10.1016/j.abb.2004.03.009.
84. Kataria Y, Deaton RJ, Enk E, Jim M, Petrauskaite M, Dong L, Goldenberg JR, Cotler SJ, Jensen DM, Breemen RBV, Gann PH. Retinoid and carotenoid status in serum and liver among patients at high-risk for liver

cancer. *BMC Gastroenterol* 2016; 16(30): 1-12. doi:10.1186/s12876-016-0432-5.

85. Fanciullino AL, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *J Agric Food Chem* 2006; 54(12): 4397-406. doi:10.1021/jf0526644.

86. Seren S, Mutchnick M, Hutchinson D, Harmanci Ó , Bayraktar Y , Mutchnick S , Sahin K , Kucuk Ó. Potential Role of Lycopene in the Treatment of Hepatitis C and Prevention of Hepatocellular Carcinoma. *Nutr Cancer* 2008; 60(6): 729-35. doi:10.1080/01635580802419772.

87. Schläger S, Dräger B. Exploiting plant alkaloids. *Curr Opin Biotechnol* 2016; 37: 155-164. doi:10.1016/j.copbio.2015.12.003.

88. Amirkia V, Heinrich M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochem Lett* 2014; 10: xlviii-liii. doi:10.1016/j.phytol.2014.06.015.

89. Yu X, Sainz B, Petukhov PA, Uprichard SL. Identification of hepatitis C virus inhibitors targeting different aspects of infection using a cell-based assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(12): 6109-20. doi:10.1128/AAC.01413-12.

90. Jardim ACG, Igloi Z, Shimizu JF, Santos VAFFM, Felipe LG, Mazzeu BF, Amako Y, Futlan M, Harris M, Rahal P. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antiviral Res* 2015; 115: 39-47. doi:10.1016/j.antiviral.2014.12.018.

91. Cao MM, Zhang Y, Peng ZG, Jiang JD, Gao YJ, Hao XJ. Schoberine B, an alkaloid with an unprecedented straight C 5 side chain, and myriberine B from *Myrioneuron faberi*. *RSC Adv* 2016; 6(12): 10180-184. doi:10.1039/C5RA25218K.
92. Song D, Wang Z, Mei R, Zhang W, Ma D, Xu D, Xie X, She X. Short and Scalable Total Synthesis of Myrioneuron Alkaloids ($\pm$)- α,β -Myrifabral A and B. *Org Lett* 2016; 18(4): 669-71. doi:10.1021/acs.orglett.6b00005.

Capítulo 2.

**Central cellular signaling pathways involved with the regulation
of lipid metabolism in the liver: a review**

Publicado em 31 de março de 2020

Acta Scientiarum Biological Sciences (ISSN: 1807-863X; QUALIS/CAPES -
CIÊNCIAS ALIMENTOS: B5).

Central cellular signaling pathways involved with the regulation of lipid metabolism in the liver: a review

Rute Lopes¹, Moema Souza Santana², Carla Rios da Cruz², Rafael Bianchini Fulindi², Ana Maria Minarelli Gaspar¹ and Paulo Inácio da Costa^{2*}

¹Department of Biotechnology, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

²Food and Nutrition Department, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

*Author for correspondence. E-mail: costapi.unesp@gmail.com

ABSTRACT

The liver is primarily responsible for energy homeostasis and the regulation of lipid, carbohydrate and protein metabolism. Lipid metabolism consists of distributing lipids to peripheral tissues or ensuring their return to the liver to be reprocessed. Additionally, cellular metabolism is regulated by several molecules in different signaling pathways. Lipid homeostasis in the liver is mainly regulated by AKT, AMPK, SREBP, PPAR, and JNK. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway results in the biosynthesis of macromolecules and regulates lipogenesis and the expression of lipogenic genes. AMPK is an energy sensor that regulates metabolism and is activated when stored ATP is depleted, and it is responsible for the suppression of several key lipogenic factors in the liver related to cholesterol and fatty acid synthesis. SREBPs control lipogenic gene expression and cholesterol metabolism and act in the nutritional regulation of fatty acids and triglycerides. The continued activation of SREBPs is associated with cellular stress, inflammation and ultimately steatosis. PPARs are intrinsically important regulators of lipid metabolism. These genes are essential to various metabolic processes, especially lipid and glucose homeostasis, and can play a role in cell differentiation. JNK signaling is related to insulin resistance and its activation results in decreased mitochondrial activity and fat accumulation. Therefore, the study of cell signaling pathways related to lipid metabolism and liver function may help to identify abnormalities and develop strategies to manage and regulate metabolic disorders and resulting complications.

Keywords: Lipid Synthesis, Hepatic Molecular Routes, Fatty Acids, Steatosis.

Introduction

The liver consists largely of hepatocytes, the major scaffold for lipoprotein synthesis, but it also contains many other cell types (Aizawa, Seki, Nagano, & Abe, 2015; La Rosa Rodriguez & Kersten, 2017). The main function of lipid metabolism is to distribute lipids to peripheral tissues or to ensure their return to the liver to be reprocessed (Tang, 2016). The fatty acids in the liver originate from the diet in energy abundant states, from de

novo lipogenesis, or are derived from the adipose tissue, and enter the liver as free fatty acids (La Rosa Rodriguez & Kersten, 2017).

The diseases or metabolic disorders related to lipid processing have a large public health impact because of both the increasing population affected worldwide and the potential of these disorders to advance to chronic complications that lead to poor quality of life, in which is associated with increased global expenditures directly connected to those health issues as well as high morbidity and mortality rates (Trogon et al., 2015). Some of the most important pathological conditions associated with lipid metabolic disorders include type 2 diabetes mellitus, obstructive sleep apnea, coronary artery disease, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and some types of cancer (Tang, 2016). Furthermore, lipid metabolism has been demonstrated to have an important role in cancer cell survival and proliferation under hypoxic conditions (Chen & Li, 2016; Tang, 2016). The central cell signaling pathways related to lipid metabolism include AKT, AMPK, SREBP, PPAR and JNK.

Understanding lipid metabolism and liver function as well as the main signaling pathways connected to these phenomena, is crucial to identify abnormalities and develop strategies to manage and regulate metabolic disorders and metabolic disorder-associated complications.

Methods

This review consists of a systematic review study about the major cell signaling pathways involved with the regulation of lipid metabolism in the liver. The databases Medline (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus (<https://www.scopus.com>) and Web of Science (<https://apps.webofknowledge.com>) were included in the search. The search was conducted using the descriptors: ("lipid metabolism") AND ("cell signaling" OR "pathway" OR "signaling") AND "steatosis". Studies were restricted to those published from 2014 to 2019, in English language.

Lipids and cell signaling pathways

Cell metabolism is regulated by several molecules in many signaling pathways and consists of biochemical stimuli transmitted to effector molecules, by the inhibition or activation of downstream molecules, to elicit an intended response.

Lipids, particularly fatty acids and cholesterol, constitute an important part of cell membranes and act as signaling factors or metabolic intermediates in many molecular pathways (Shimano & Sato, 2017). A summary of the cellular signaling interactions connected to lipid metabolism in the liver is shown in Table 1.

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

Signaling pathways	Cellular regulation	Metabolic effects	References
AKT	- Growth regulation, metabolism control - Glucose metabolism: ↑ glucose transporters on cell surface → glycolysis - ↓ FOXO1: ↓ gluconeogenesis - ↑ PI3K/AKT/mTOR: biosynthesis of macromolecules	- Insulin resistance: FOXO1 activation → ↓ AKT → hyperglycemia and phosphorylation of IRS-1, ↓ GLUT-4 translocation, ↓ glucose transported into cells - Caloric abundance: ↑ mTOR → ↑ lipid droplets	Hirata et al., 2018; Józwiak, Forma, Brys, & Krzeslak, 2014; Manning & Toker, 2017; Semenkovich, Goldberg, & Goldberg, 2016; Welty, Alfaddagh, & Elajami, 2016; Zhang et al., 2018
AMPK	- ↑ demand for energy or caloric restriction: ↓ ATP → ↑ AMP/ATP - SIRT1 acetylation: simulates a caloric depleted state → AMPK activation → ↓ de novo lipogenesis and ↑ insulin sensitivity, lipolysis, and mitochondrial fatty acid (FA) oxidation	- ↓ insulin sensitivity: ↓ AMPK, defective autophagy and ROS generation - Starvation: ↑ autophagy, to ↑ nutrients available to cells → ↑ ULK1 and mTORC1 - AMPK improves NASH induced by high-fat-diet: suppression of several	Li, Lian, Liu, Hu, & Wang, 2015; Musso, Cassader, & Gambino, 2016; Navarro-Yepes et al., 2014; Sinha, Singh, & Yen, 2018; Su, Cao, He, Guan, & Ruan, 2017; Yang, Vijayakumar, & Kahn, 2018

	- TSH → AMPK: ↓ HMG-CoAR and ↓ cholesterol synthesis	key lipogenic factors, such as SREBP-1 (↓ triglyceride synthesis), HMG-CoAR, cholesterol synthesis; and ↑ ACC: ↓ malonyl-CoA, ↓ FFA and VLDL synthesis	
SREBP	- SREBP-1c phosphorylates genes involved in FA synthesis - Insulin and AKT/mTORC1: activation and nuclear accumulation of SREBP1c → ↑ de novo lipid synthesis and protein synthesis - mTORC1 → LPIN1/SREBP: synthesis of phospholipids (phosphatidylcholine, triglycerides). - AKT: ↓ GSK3β, ↑ SREBP → lipid biosynthesis enzymes	- mTORC1 → SREBP: ↑ cholesterol synthesis and accumulation - Caloric abundance: activated UPR and SREBP → ER stress, inflammation response and steatosis → ↑ lipotoxicity: obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis, NAFLD, NASH, and other metabolic disorders	Manning & Toker, 2017; McRae et al., 2016; Musso et al., 2016; Röhrig & Schulze, 2016; Shimano & Sato, 2017
PPAR	- PPAR-α: fatty acid receptor, activated by high levels of triglycerides in the liver → ↑ FA β-oxidation, ↓ lipid accumulation - ↑ lipolysis: ↓ triglycerides, VLDL production and ↑ ApoA-I and ApoA-II (HDL) - Glucagon: ↑ PPAR-α. AMPK (fasting): ↑ PPAR-α → ↑ FA oxidation - Insulin, mTORC1/AKT and S6K2: ↓ PPAR-α → ↑ ketogenesis	- Caloric abundance: PPAR-α activation reverses suppression of autophagy, improving NAFLD - Exercise: ↑ PPAR-δ → lipolytic activity. - PPAR-δ: ↓ LDL and triglyceride, ↑ lipid catabolism and ↓ weight gain - PPAR-γ: adipogenic function → weight gain. Caloric restriction does	Jahansouza et al., 2018; Janani & Kumari, 2015; Lodhi & Semenkovich, 2014; Pawlak, Lefebvre, & Staels, 2015; Régnier et al., 2018; Welty et al., 2016; Zhang et al., 2018

	- PPAR- γ : insulin sensitivity → $\uparrow$ adipocytokines, adiponectin, and leptin - PPAR- γ : lipid metabolism, lipogenesis, fat storage and other related effects	not induce changes in the activity of PPAR- γ or PPAR- δ	
JNK	- JNK: $\downarrow$ AKT $\rightarrow$ SRC altered by saturated FA $\rightarrow$ insulin resistance - TNF- α : activates JNK $\rightarrow$ $\downarrow$ IKK- β $\rightarrow$ $\uparrow$ serine phosphorylation of IRS-1 $\rightarrow$ insulin resistance and metabolic syndrome - $\uparrow$ Bcl-2/Beclin-1 $\rightarrow$ $\downarrow$ AMPK $\rightarrow$ $\downarrow$ autophagy/JNK/IKK- β	- $\downarrow$ JNK: $\downarrow$ autophagy $\rightarrow$ lipid accumulation $\rightarrow$ NAFLD - JNK: modulate NCOR- 1 $\rightarrow$ $\downarrow$ PPAR- α $\rightarrow$ $\downarrow$ mitochondrial activity and $\uparrow$ fat accumulation: NASH	Baiceanu, Mesdom, Lagouge, & Foulle, 2016; Navarro-Yepes et al., 2014; Welty et al., 2016; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2018
	Key: $\uparrow$ increased/stimulation; $\downarrow$ decreased/inhibition; $\rightarrow$ result in.		

AKT/PKB

The serine and threonine kinase (AKT), also known as protein kinase B (PKB), is a key regulator of many intracellular signal transduction processes that mediate cell survival (Hirata et al., 2018). There are three AKT isoforms: AKT1, AKT2, and AKT3 (Manning & Toker, 2017). AKT1 is linked to growth regulation, and it is the most prevalent isoform. AKT2 is related to the control of metabolism, and AKT3 is mostly expressed in the brain where it also regulates growth (Semenkovich et al., 2016).

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is a lipid kinase related to insulin response and cellular metabolism that is activated by extracellular signals. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is involved in cellular growth and glucose metabolism regulation. AKT influences the activity of enzymes and the transcription factors involved in various pathways (Józwiak et al., 2014; Manning & Toker, 2017).

In glucose metabolism, the phosphorylation of PI3K/AKT increases the expression of glucose transporters on the cell surface, which activates hexokinase, the enzyme responsible for glucose phosphorylation and

phosphofructokinase-1 activation, ultimately leading to glycolysis (Józwiak et al., 2014). Additionally, AKT activation inhibits forkhead box protein O1 (FOXO1), resulting in the inhibition of gluconeogenesis and the reduction of plasma glucose levels. In insulin resistance, hyperglycemia is caused by the inhibition of AKT through FOXO1 activation. Additionally, the phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) reduces insulin signaling and promotes insulin resistance in the liver, muscles, and other tissues by diminishing the activation of PI3K/AKT2, attenuating the insulin-responsive glucose transporter 4 (GLUT-4) translocation to the plasma membrane, and ultimately inhibiting the transport of glucose into cells (Welty et al., 2016).

The overconsumption of nutrients and increased intracellular concentration of lipid droplets are linked to the upregulation of mTOR, a lipophagy inhibitor and catalytic subunit of the mTORC1 and mTORC2 complexes, in the liver. The activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway results in the biosynthesis of macromolecules. In contrast, lipophagy is inhibited either by the mTOR complex or by the insulin-induced inhibition of FOXO1 and transcription factor EB (TFEB), which control the transcription of autophagy genes. Lipid usage via lipophagy involves the regulation of other autophagy genes, such as cAMP-response element binding protein (CREB), nuclear farnesoid X receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α). PI3K/AKT regulates lipogenesis and the expression of lipogenic genes in various cell types (Józwiak et al., 2014; Zhang et al., 2018). Cholesterol-lowering agents are linked to decreased PI3K/AKT/mTOR activity and increased autophagy in hepatocytes (Wang, Ding, & Li, 2018).

AMPK

5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is a major energy sensor. It regulates metabolism and is especially associated with glycolysis, which is activated when there is depletion of stored ATP and therefore an increase in the AMP/ATP ratio due to higher demand for energy or caloric restriction (Musso et al., 2016; Navarro-Yepes et al., 2014). AMPK regulates autophagy, which is a way to increase the nutrients available to cells under starvation conditions, by the regulation of Unc-51-like autophagy

activating kinase 1 (ULK1) and mTORC1 complexes. AMPK can also be activated via mitochondrial reactive oxygen species (ROS) formation as a result of hypoxia (Navarro-Yepes et al., 2014). Similarly, the inactivation of AMPK induced by reduced insulin sensitivity not only results in defective autophagy but also leads to ROS generation (Yang et al., 2018).

AKT signaling and the AMPK pathway have several shared regulatory steps. AKT is associated with glucose uptake and glycolysis resulting in ATP synthesis, which in turn causes AMPK to remain inactive. AKT can also directly block AMPK activation through the phosphorylation of a C-terminal residue on AMPK, which blocks AMPK phosphorylation by liver kinase B1 (LKB1). These two signaling pathways sometimes have equivalent roles and other times have opposing roles; for example, both pathways can increase glucose metabolism in response to different stimuli and AKT stimulates anabolic activities for ATP consumption while AMPK halts anabolism to produce ATP. AKT and AMPK also have opposing roles in protein synthesis, lipogenesis, glycogenesis, mTORC1 signaling, and autophagy (Manning & Toker, 2017).

AKT and AMPK pathways affect autophagy in an opposed manner as well. The inhibition of the PI3K/AKT/mTORC1 complex pathway, as a result of growth factor stimulation, leads to the phosphorylation of autophagy-related protein 13 (ATG13), which prevents ATG13 from entering the ULK1 complex and consequently blocks the recruitment of ATG13 to the pre-autophagosomal complex, subsequently inhibiting autophagy. Antagonistically, under conditions of low energy, such as glucose or amino acid starvation, the AMP/ATP ratio increases, leading to AMPK activation, mTOR inhibition, and autophagy activation (Musso et al., 2016; Navarro-Yepes et al., 2014; Park et al., 2016; Sinha et al., 2018).

Silent information regulator T1 (SIRT1) is a protein involved in the activity of proteins and enzymes that are important regulators of glucose and lipid metabolism, as well as energy levels. SIRT1 acetylation simulates a calorie depletion state, resulting in AMPK activation. This effect leads to reduced de novo lipogenesis and increased insulin sensitivity, lipolysis, and

mitochondrial fatty acid oxidation (Li, Lian, Liu, Hu, & Wang, 2015; Musso et al., 2016).

Hepatic lipid metabolism is also affected by thyroid hormones when the cAMP-protein kinase A (PKA) and Ca^{2+} /AMPK pathways are activated. Thyroid stimulating hormone (TSH) can increase the phosphorylation of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase enzyme (HMG-CoAR), mediated by AMPK, to inhibit HMG-CoAR activity, which in turn results in reduced cholesterol synthesis (Sinha et al., 2018).

Regarding lipid metabolism, phosphorylated AMPK can also improve high-fat-diet-induced NASH through the suppression of several key lipogenic factors in the liver related to cholesterol and fatty acid synthesis, such as sterol regulatory element-binding protein (SREBP-1), which results in reduced triglyceride synthesis, HMG-CoAR levels, cholesterol synthesis, and ACC enzyme activation, which in turn decreases malonyl-CoA levels and reduces free fatty acids and VLDL synthesis (Musso et al., 2016; Su et al., 2017).

SREBP

SREBPs are nuclear transcription factors that control the expression of enzymes involved in fatty acid biosynthesis. SREBPs are synthesized as precursors bound to the endoplasmic reticulum (ER) membrane and are complexed with SREBP cleavage-activating protein (SCAP), which promotes the translocation of SREBPs to the Golgi, where they are cleaved to then move into the nucleus. SREBPs present three active isoforms after cleavage: SREBP-1a, SREBP-1c, and SREBP-2. SREBP-2 is the main regulator of intracellular cholesterol homeostasis, while SREBP-1c phosphorylates genes involved in fatty acid synthesis (McRae et al., 2016; Musso et al., 2016).

SREBP1c is expressed in most tissues, controlling lipogenic gene expression, and acting in the nutritional regulation of fatty acids and triglycerides in organs such as the liver, while SREBP-1a is mostly expressed in the heart, intestinal epithelium, macrophages and bone marrow dendritic cells, where it activates global lipid synthesis in rapidly growing cells. SREBP-2 regulates the transcription of genes related to cholesterol

metabolism in every tissue (Shimano & Sato, 2017). An abundance of cholesterol in the ER membrane causes SCAP to bind to the products of insulin-induced genes (INSIGs), causing the SREBP-SCAP complex to be confined to the ER. The membrane-bound transcription factor site-1 protease (MBTPS1) and MBTPS2 are transferred from the Golgi to the ER membrane and activate SREBP-1, as a consequence of reduced phosphatidylcholine levels (Röhrig & Schulze, 2016).

The cleavage of SREBPs has been shown to be stimulated by the PI3K/AKT/mTOR pathway (Boyd & Ye, 2018). The activation and nuclear accumulation of SREBP-1c by the insulin and AKT/mTORC1 signaling pathways in the liver enhances de novo lipid synthesis and is also related to protein synthesis throughout cell growth processes (Manning & Toker, 2017; Röhrig & Schulze, 2016). mTORC1 regulates anabolism by inducing lipid, nucleotide and protein synthesis, therefore hindering catabolic processes such as autophagy. mTORC1 activation also increases cholesterol synthesis and uptake through the regulation of SREBP-2, causing cholesterol accumulation (Musso et al., 2016).

After the activation of the mTORC1 pathway, SREBP is regulated by phosphatidate phosphatase lipin 1 (LPIN1), an enzyme that converts phosphatidic acid into diacylglycerol and is involved in the synthesis of phospholipids, such as phosphatidylcholine, or triglycerides. The AKT phosphorylation pathway inhibits the glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), further inducing SREBP processing and improving its stability to promote the expression of lipid biosynthesis enzymes (Röhrig & Schulze, 2016).

Cholesterol and fatty acid homeostasis vary in different nutritional states; SREBP-1 and SREBP-2 are activated under conditions of energy abundance, whereas in energy depleted states, they are inhibited. ER stress may be initiated by SREBP-1 activation as well as protein synthesis. To reestablish homeostasis, the unfolded protein response (UPR) is activated; however, in addition to the existing ER stress, SREBP-1c continues to be activated, establishing the conditions for cellular stress, inflammation response and ultimately steatosis. The resulting lipotoxicity is a feature that

characterizes obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), NASH, and other metabolic disorders (Shimano & Sato, 2017). In NAFLD, SREBP-2 might be atypically activated, stimulating excessive cholesterol accumulation (Zhang et al., 2018).

Hepatosteatosis may also be caused by the stimulation of TSH receptors expressed in hepatocytes via SREBP-1c. Thyroid hormone induces the expression of HMG-CoAR and farnesyl pyrophosphate synthetase (FDPS) to stimulate hepatic cholesterol synthesis, upregulates LDL receptor levels to increase cholesterol efflux from peripheral tissues, and intensifies HDL metabolism by stimulating cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity (Sinha et al., 2018). Figure 1 schematizes the studied pathways association with hepatosteatosis.

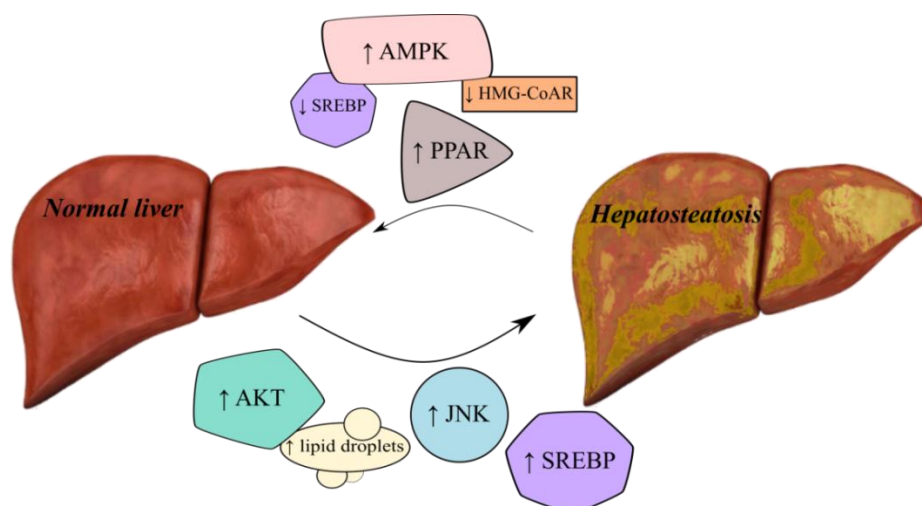


Figure 1. The role of cell signaling molecules regarding steatosis.

PPAR

The transcription of genes responsible for metabolic regulation is controlled by various transcription factors that are susceptible to altered nutrient conditions, including peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), which can be classified as PPAR- α , PPAR- δ , and PPAR- γ (Kersten & Stienstra, 2017; McMullen et al., 2014; Welty et al., 2016).

PPARs are intrinsically important regulators of lipid metabolism. They are transcription factors that shift to the nucleus following activation by ligands, forming heterodimers with binding partners such as retinoid X receptors (RXR), and then binding to specific DNA sequences known as

PPAR response elements (PPREs) in the promoters of target genes, where they substitute corepressors with coactivators to finally activate the expression of the target gene. These genes are essential to various metabolic processes, especially lipid and glucose homeostasis, and can play a role in cell differentiation (Janani & Kumari, 2015; Lodhi & Semenkovich, 2014; Régnier et al., 2018).

PPAR- α

PPAR- α is mainly expressed in the liver where it regulates lipid metabolism, especially during fasting. It is also expressed in the large and small intestines, heart, kidneys, spleen and in white and brown adipose tissues, where it regulates fatty acid oxidation, ketogenesis, adipogenesis, energy balance, and triglyceride metabolism and storage (Feng et al., 2016; Jahansouz et al., 2018; McMullen et al., 2014).

PPAR- α is a fatty acid receptor and a major regulator of hepatocyte and fatty acid homeostasis. It acts as a nutritional sensor, activated by high levels of circulating triglycerides in the liver, which in turn activates the expression of genes involved in fatty acid β -oxidation and inhibits lipid accumulation. PPAR- α is also a transcriptional regulator of genes involved in fatty acid transport and in peroxisomal and mitochondrial β -oxidation. PPAR- α phosphorylation reduces triglyceride levels by increasing lipolysis, inducing LPL to catalyze the hydrolysis of triglycerides into free fatty acids and monoacylglycerol; PPAR- α inhibits VLDL production and stimulates the production of ApoA-I and ApoA-II, which are associated with HDL (Musso et al., 2016; Pawlak et al., 2015; Su et al., 2017).

During fasting, fatty acid oxidation in the hepatic and peripheral tissues increases, producing acetyl-CoA, which is converted into ketone bodies to provide energy for peripheral tissues. Then, PPAR- α upregulates mitochondrial HMG-CoA synthetase, which in turn catalyzes the reaction of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA to produce HMG-CoA and CoA (Pawlak et al., 2015). Additionally, glucagon stimulates PPAR- α activity. Insulin, along with the mTORC1/AKT/PKB pathway and its downstream effector S6K2, inhibits PPAR- α through the recruitment of nuclear receptor corepressor 1

(NCOR1), hence increasing ketogenesis. Hepatic PPAR- α activity can also be stimulated by AMPK during fasting. Fatty acid oxidation is increased by adiponectin through AMPK-dependent PPAR- α activation (Pawlak et al., 2015; Régnier et al., 2018).

PPAR- α agonists increase human SREBP-1c transcriptional activity through interacting with a direct repeat-1 element in the SREBP-1c promoter, and it also acts on SREBP-1c transcription through cross-regulation with the LXR signaling pathway (Pawlak et al., 2015). Finally, SIRT1 connects cell metabolism to PPAR- α activity (Régnier et al., 2018).

PPAR- α agonists and omega-3 reduce plasma triglyceride levels and LDL particles, and synthetic PPAR- α agonists may be very useful in the treatment of NAFLD and cardiovascular diseases (Pawlak et al., 2015; Welty et al., 2016). In previous studies, dietary abundance and PPAR- α activation reversed the normal suppression of autophagy. This resulted in increased autophagic lipid degradation and represents a potential pharmacological target to inhibit several chronic liver diseases related to lipid accumulation (Zhang et al., 2018).

PPAR- δ

PPAR- δ (or PPAR- β) is expressed in most cells and tissues, particularly in adipose tissue, where it promotes lipid usage by stimulating genes involved in fatty acid oxidation (Jahansouza et al., 2018; Janani & Kumari, 2015; McMullen et al., 2014).

PPAR- δ activation lowers LDL and triglyceride levels, mitigating triglyceride accumulation in the liver and adipose tissue, increasing lipid catabolism and consequently decreasing weight gain. Exercise upregulates PPAR- δ , which in turn helps with fatty acid and lipolytic activity. Currently, there are no pharmacological agonists for PPAR- δ (Welty et al., 2016). The simultaneous activation of PPAR- α and PPAR- δ initiates weight gain and fat accumulation due to PPAR- γ agonism. The combination of PPAR- δ and PPAR- γ agonists, in turn, can alleviate insulin resistance and regulate glucose metabolism (La Rosa Rodriguez & Kersten, 2017; Feng et al., 2016).

PPAR- γ

PPAR- γ is only expressed in a limited number of cells and tissues. It is highly abundant in adipose tissue, but it is also found in the liver, muscle, colon, and macrophages. PPAR- γ regulates adipogenesis and the balance between glucose and lipid oxidation (La Rosa Rodriguez & Kersten, 2017).

Adipose PPAR- γ protects the liver and skeletal muscle tissues against excess lipids and maintains normal organ function (Janani & Kumari, 2015).

PPAR- γ is involved in the regulation of insulin sensitivity via stimulating the secretion of adipocytokines, adiponectin, and leptin in adipocytes, which are mediators of insulin action in peripheral tissues (Janani & Kumari, 2015; Lodhi & Semenkovich, 2014). PPAR- γ is also involved in lipid metabolism, lipogenesis, fat storage, adipokine production, thermogenesis, and adipocyte survival, differentiation and function (Lodhi & Semenkovich, 2014).

Due to its adipogenic function, increasing PPAR- γ activity causes weight gain; however, caloric restriction does not induce changes in the activity of PPAR- γ or PPAR- δ (Jahansouza et al., 2018; Janani & Kumari, 2015).

JNK

The activation of the Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway is crucial for the autophagic process, contributing to Beclin-1 expression, which modulates autophagy dysregulation and p53 phosphorylation. The inhibition of JNK suppresses autophagy and attenuates insulin resistance. Autophagic dysfunction may lead to excessive lipid accumulation in the liver, contributing to the progression of NAFLD (Zhang et al., 2018).

JNK signaling inhibits AKT in the insulin cascade. In this case, insulin resistance may occur when the membrane distribution of proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC is altered by saturated fatty acids, which causes the stimulation of JNK signaling (Welty et al., 2016; Yang et al., 2018). TNF- α signaling activates intracellular JNK and inhibits nuclear factor kappa-B

kinase subunit β (IKK- β), which leads to increased activating phosphorylation of serine on IRS-1 instead of normal tyrosine phosphorylation. Thus, an adipocyte product can cause insulin resistance and metabolic syndrome (Welty et al., 2016). The autophagy and JNK/IKK- β signaling pathways are inhibited when the interaction between B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Beclin-1 is increased, and AMPK activation is decreased. Moreover, when JNK phosphorylates Bcl-2, autophagy is stimulated (Navarro-Yepes et al., 2014).

The JNK pathway is presumed to be involved in the impaired activity of oxidative phosphorylation in advanced steatosis and NASH. JNK activation during steatosis-associated ER stress can modulate NCOR-1 activity, inhibiting PPAR- α and subsequently causing decreased mitochondrial activity and facilitating fat accumulation (Baiceanu et al., 2016). Figure 2 summarizes the cell signaling pathways involved in lipid metabolism, as previously described.

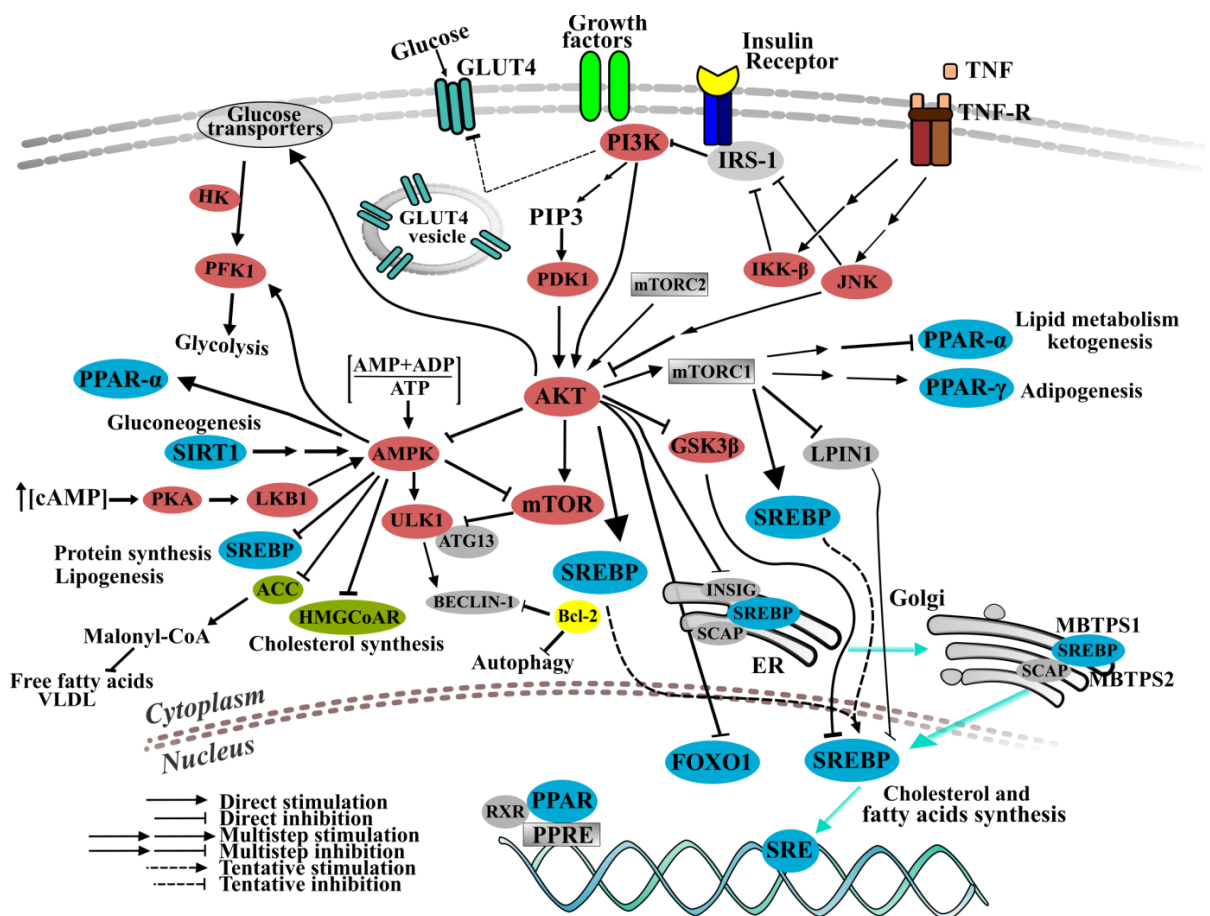


Figure 2. Cell signaling pathways involved in lipid metabolism.

Conclusion

Metabolic disorders have a distinct potential to advance to chronic complications, such as insulin resistance, type 2 diabetes, and NAFLD. Nevertheless, there have been substantial advances in the understanding of the mechanisms of lipid metabolism. These advances, together with the acquired knowledge in the field of cell signaling pathways related to carbohydrate and lipid processing, provide deeper insight into the metabolism of fatty acids, triglycerides, lipoprotein, and lipids. These are important tools that should be addressed when studying the effects of new strategies to provide education regarding the importance of nutrition and exercise or when developing effective therapeutic interventions.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support by CAPES/FCFAR-UNESP/PADC (Process: 250 - 10/2017) and FAPESP (Process: 2017/04500-9). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Aizawa, Y., Seki, N., Nagano, T., & Abe, H. (2015). Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 21(36), 10299–10313. Doi: 10.3748/wjg.v21.i36.10299
- Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M., & Fofelle, F. (2016). Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(12), 710–722. Doi: 10.1038/nrendo.2016.124
- Boyd, R. A. d. B., & Ye, J. (2018). SREBPs in lipid metabolism, insulin signaling, and beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(5), 358–368. Doi: 10.1016/j.tibs.2018.01.005

- Chen, Y., & Li, P. (2016). Fatty acid metabolism and cancer development. *Science Bulletin*, 61(19), 1473–1479. Doi: 10.1007/s11434-016-1129-4
- Feng, L., Luo, H., Xu, Z., Yang, Z., Du, G., Zhang, Y., ... Li, Y. (2016). Bavachinin, as a novel natural pan-PPAR agonist, exhibits unique synergistic effects with synthetic PPAR- γ and PPAR- α agonists on carbohydrate and lipid metabolism in db/db and diet-induced obese mice. *Diabetologia*, 59(6), 1276–1286. Doi: 10.1007/s00125-016-3912-9
- Hirata, N., Suizu, F., Lennikov, M. M., Tanaka, T., Edamura, T., Ishigaki, S., ... Noguchi, M. (2018). Functional characterization of lysosomal interaction of Akt with VRK2. *Oncogene*, 37, 5367-5386. Doi: 10.1038/s41388-018-0330-0
- Jahansouza, C., Xu, H., Hertz, A. V., Kizy, S., Steen, K. A., Foncea, R., ... Bernlohr, D. A. (2018). Partitioning of adipose lipid metabolism by altered expression and function of PPAR isoforms after bariatric surgery. *International Journal of Obesity*, 42(2), 139–146. Doi: 10.1038/ijo.2017.197
- Janani, C., & Kumari, B. D. R. (2015). PPAR gamma gene - a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46–50. Doi: 10.1016/j.dsx.2014.09.015
- Józwiak, P., Forma, E., Brys, M., & Krzeslak, A. (2014). O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 145. Doi: 10.3389/fendo.2014.00145
- Kersten, S., & Stienstra, R. (2017). The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie*, 136, 75–84. Doi: 10.1016/j.biochi.2016.12.019

- La Rosa Rodriguez, M. A. d., & Kersten, S. (2017). Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(10B), 1212–1220. Doi: 10.1016/j.bbalip.2017.07.007
- Li, X., Lian, F., Liu, C., Hu, K.-Q., & Wang, X.-D. (2015). Isocaloric pair-fed high-carbohydrate diet induced more hepatic steatosis and inflammation than high-fat diet mediated by miR-34a/SIRT1 axis in mice. *Scientific Reports*, 5, 16774. Doi: 10.1038/srep16774
- Lodhi, I. J., & Semenkovich, C. F. (2014). Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metabolism*, 19(3), 380–392. Doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.002
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, 169(3), 381–405. Doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001
- McMullen, P. D., Bhattacharya, S., Woods, C. G., Sun, B., Yarborough, K., Ross, S. M., ... Andersen, M. E. (2014). A map of the PPARα transcription regulatory network for primary human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 209, 14–24. Doi: 10.1016/j.cbi.2013.11.006
- McRae, S., Iqbal, J., Dutta, M. S., Lane, S., Nagaraj, A., Ali, N., & Waris, G. (2016). The hepatitis C virus-induced NLRP₃ inflammasome activates the sterol regulatory element-binding protein (SREBP) and regulates lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3254–3267. Doi: 10.1074/jbc.M115.694059

- Musso, G., Cassader, M., & Gambino, R. (2016). Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(4), 249–274. Doi: 10.1038/nrd.2015.3
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., ... Franco, R. (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(1), 66–85. Doi: 10.1089/ars.2014.5837
- Park, J.-M., Jung, C. H., Seo, M., Otto, N. M., Grunwald, D., Kim, K. H., ... Kim, D.-H. (2016). The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy*, 12(3), 547–564. Doi: 10.1080/15548627.2016.1140293
- Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 62(3), 720–733. Doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.039
- Régnier, M., Polizzi, A., Lippi, Y., Fouché, E., Michel, G., Lukowicz, C., ... Montagner, A. (2018). Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 471, 75–88. Doi: 10.1016/j.mce.2017.07.035
- Röhrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(11), 732–749. Doi: 10.1038/nrc.2016.89
- Semenkovich, C. F., Goldberg, A. C., & Goldberg, I. J. (2016). Disorders of Lipid Metabolism. In S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen & H. M.

- Kronenberg (Eds.), *Williams textbook of endocrinology* (13th ed., p. 1660–1700). Philadelphia: Elsevier. Doi: 10.1016/B978-0-323-29738-7.00037-X
- Shimano, H., & Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology — divergent pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(12), 710–730. Doi: 10.1038/nrendo.2017.91
- Sinha, R. A., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2018). Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(5), 259–269. Doi: 10.1038/nrendo.2018.10
- Su, W., Cao, R., He, Y. C., Guan, Y. F., & Ruan, X. Z. (2017). Crosstalk of hyperglycemia and dyslipidemia in diabetic kidney disease. *Kidney Diseases*, 3(4), 171–180. Doi: 10.1159/000479874
- Tang, Q.-Q. (2016). Lipid metabolism and diseases. *Science Bulletin*, 61(19), 1471–1472. Doi: 10.1007/s11434-016-1174-z
- Trogdon, J. G., Murphy, L. B., Khavjou, O. A., Li, R., Maylahn, C. M., Tangka, F. K., ... Orenstein, D. (2015). Costs of chronic diseases at the state level: the chronic disease cost calculator. *Preventing Chronic Disease*, 12(E140), 1-9. Doi: 10.5888/pcd12.150131
- Wang, Y., Ding, W.-X., & Li, T. (2018). Cholesterol and bile acid-mediated regulation of autophagy in fatty liver diseases and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(7), 726–733. Doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.005
- Welty, F. K., Alfaddagh, A., & Elajami, T. K. (2016). Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Translational Research – The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 167(1), 257–280. Doi: 10.1016/j.trsl.2015.06.017

Yang, Q., Vijayakumar, A., & Kahn, B. B. (2018). Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 19(10), 654–672. Doi: 10.1038/s41580-018-0044-8

Zhang, Z., Yao, Z., Chen, Y., Qian, L., Jiang, S., Zhou, J., ... Zheng, S. (2018). Lipophagy and liver disease: new perspectives to better understanding and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 339–348. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.168

Capítulo 3.

**Efeito do resveratrol e derivado sobre a morte celular e
replicação do Vírus da Hepatite C**

Redigido para ser enviado à revista

Bioscience Journal (ISSN: 1981-3163; QUALIS/CAPES - CIÊNCIAS
ALIMENTOS: B3).

Efeito do resveratrol e derivado sobre a morte celular e replicação do Vírus da Hepatite C

Moema Souza Santana¹, Rute Lopes², Jean Leandro dos Santos³ and Paulo Inácio da Costa^{1*}

¹Food and Nutrition Department, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

²Department of Biotechnology, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

³Department of Pharmaceutical and Medication, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

*Author for correspondence. E-mail: costapi.unesp@gmail.com

Resumo

Introdução: As complicações relacionadas à cronicidade de hepatite C estão associadas com o aumento do estresse oxidativo promovido do VHC, que causa danos ao DNA, alterações na peroxidação lipídica e está associada a morte celular. O resveratrol (RVT) apresenta ampla ação antioxidante, e potencial de síntese de derivados. O f-resveratrol, derivado RVT com a adição de uma molécula de flúor apresenta atividade antioxidante promissora. **Objetivo:** Avaliar o efeito do RVT e do F-RVT sobre o perfil de morte celular e a replicação do VHC. **Métodos:** O trabalho foi desenvolvido utilizando células Huh-7.5 e células Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1. Os CNBs analisados foram o RVT e o F-RVT. A análise de viabilidade das células foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de MTT. Análise do mecanismo de apoptose e necrose foi realizada por citometria de fluxo. A quantificação de RNA do VHC foi realizada nas células SGR-JFH1 sem tratamento e pós-tratamento. Aplicou-se o modelo de análise de variância, a nível de 5% de probabilidade. **Resultados:** O controle positivo (H₂O₂) apresentou expressiva citotoxicidade, 80% de morte nas células SGR-JFH1 e de 95% nas células Huh-7.5. Os compostos apresentaram a tendência à 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 influencia dos tratamentos com os CNBs sob o padrão de necrose nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1. Verificou-se ainda redução da carga viral intracelular como efeitos dos tratamentos com RVT e F-RVT em 1 dia em tratamentos e ausência de influência na carga viral extracelular no mesmo período. **Conclusão:** Os RVT e o F-RVT apresentaram efeito sobre a indução de apoptose precoce em células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 e sobre a redução da carga viral intracelular do VHC.

Palavras-Chave: Resveratrol, Apoptose, Necrose, Carga Viral.

Introdução

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva pertencente a família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*.

Este vírus gera um processo infeccioso e inflamatório que afeta os hepatócitos, que pode manifestar-se de forma aguda ou crônica, denominado hepatite C (CHAMPEIMONT et al., 2016; DUBUISSON & COSSET, 2014). A forma mais comum e grave de hepatite C é a forma crônica, que pode levar complicações como fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular ((BURKE & COX, 2010). As complicações relacionadas à cronicidade de hepatite C estão associadas com o aumento do estresse oxidativo induzido pela presença do VHC. Assim, a hepatite C crônica caracteriza-se pelo entre sistemas antioxidante e pró-oxidante provocado pelo aumento do metabolismo celular dos hepatócitos, redução da expressão de enzimas antioxidantes, elevação níveis séricos de proteína C reativa (marcador de inflamação), de citocinas pró-inflamatórias, como tumor fator de necrose alfa e de enzimas hepáticas, como alanina transaminase e aspartato transaminase (GONÇALVES et al., 2017).

Este desequilíbrio pode promover danos ao DNA e alterações na peroxidação lipídica das membranas celulares (alteração a permeabilidade, fluidez e integridade). Os danos ao DNA e peroxidação lipídica das membranas celulares estão associados a formação de produtos citotóxicos e morte celular (FRANÇA et al., 2013). Neste sentido, vale ressaltar a diferença entre os processos de apoptose e de necrose celular. A apoptose refere-se à morte celular programada em processo ordenado que não produz danos celular, onde o conteúdo celular modifica-se morfológicamente por meio de condensação, encolhimento (colapso do citoesqueleto e dissolução do envelope nuclear) e alterações da superfície celular (sinalização para fagocitose realizada por macrófagos). A necrose, por sua vez, é um processo patológico e desordenado de morte celular causado por fatores que levam à lesão celular irreversível e consequente morte celular (CAPONE et al., 2012; CROWLEY et al., 2016; DIESEN & KUO, 2010).

Alguns estudos sugerem que os suplementos antioxidantes podem minimizar os efeitos deletérios do vírus por meio da compensação do estresse oxidativo gerado pelo VHC (SHERIFF & DEVAKI, 2013; SEREN et al., 2013; JARDIM et al., 2015; SONG et al., 2016). Neste sentido, a

utilização do resveratrol (RVT), polifenol natural com estrutura estilbeno produzido por algumas plantas como defesa contra patógenos e exposição excessiva à radiação ultravioleta, pode ser promissora devido ao seu grande potencial antioxidante e ampla atividade biológica já documenta (efeito cardioprotetor, atividade antimutagênica/antitumorais, anticarcinogênica, antiagregante plaquetária, anti-inflamatórias e antivirais) relacionada à sua atuação antioxidante e inibidora da clcoxigenase (GAMBINI et al., 2015; KULKARNI & CANTÓ, 2015).

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 composto derivado do resveratrol a com adição da molécula de flúor. Este composto com peso molecular de 299,13 g/mol, aqui é 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. Apesar de não ter sua atividade biológica completamente elucidada, acredita-se no efeito potencial do F-RVT sobre o VHC por sua capacidade antioxidante.

Assim, considerando o grande potencial antioxidante desde compostos o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do RVT e do F-RVT sobre a replicação do VHC e o perfil de morte celular (apoptose precoce e necrose) em células Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido utilizando células Huh-7.5 e células Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1. Estas linhagens celulares foram cedidas pela Profa. Dra. Paula Rahal do Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, com autorização da detentora das linhagens, "Apath L.L.C.",

documentada por acordo de transferência de material acadêmico número 1590 (linhagem celular Huh-7.5) e 1591 (APP1022 pSGR-JFH1), ao orientador desta pesquisa, Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara. As células Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1 foram alvo deste trabalho considerando sua estabilidade na realização de todas as etapas da replicação do VHC.

Os CNBs analisados foram: RVT e F-RVT.

Cultura celular

As células Huh-7.5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM - Sigma D1152 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% solução de aminoácidos não-essenciais, penicilina 10.000 U mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹ (meio de cultura completo – DMEM-C). As células SGR-JFH1 com gene de resistência à neomicina foram cultivadas em meio DMEM-C contendo 500 µg mL⁻¹ de geneticina (G418). Ambas foram mantidas em estufa umidificada com 5% CO₂ a 37° C, com troca do meio de cultura a cada dois dias, e colhidas quando alcançada a concentração necessária para a realização dos experimentos com solução de tripsina EDTA - Sigma T4049 0,25% em solução salina de Hanks. A contagem de células foi realizada por coloração com azul de Trypan 0,2% (m/v) em PBS, em câmara de Neubauer.

Análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A análise de viabilidade das células foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) seguindo a metodologia descrita na literatura com algumas modificações padronizadas no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular – FCFAr, UNESP, Araraquara. A partir deste ensaio determinou-se a concentração em que os CNBs apresentam citotoxicidade às células, bem como a concentração inibitória média (CI₅₀) (TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987).

As suspensões de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram preparadas em meio de cultura em concentração de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} , em placa de cultura celular de 96 poços de fundo plano, distribuídas em volume de 100 μL /poço, incubadas em estufa umidificada a 5% CO_2 e 37°C por 24 h. Depois deste período, o meio de cultura foi removido e as células tratadas com os CNBs concentrações de 3,9 a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para compostos estudados RVT e F-RVT.

As células foram novamente incubadas por 24 h, seguindo as condições anteriormente descritas. Após este período, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com PBS 1 $\times$ e adicionou-se 100 μL /poço de solução de MTT a 2 mg mL^{-1} em meio DMEM incompleto. A placa foi incubada novamente por um período de 3 h. A solução de MTT foi então removida e foram pipetados 100 μL /poço de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma D4540).

As placas foram então mantidas em agitação por 5 min em temperatura ambiente e ao abrigo de luz e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 490 nm com filtro de referência em 630 nm. O controle positivo (CP) de morte celular constituiu-se por células em meio de cultura contendo 1 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o branco por DMEM, o controle negativo (CN), considerado 100% da viabilidade celular (VC), por células incubadas apenas em DMEM-C, para o controle de viabilidade celular empregou as células em meio de cultura contendo DMSO 1% (v/v), concentração máxima utilizada na diluição dos CNBs.

O cálculo das concentrações inibitórias (CI_{50} , CI_{20} e CI_{10}) foi realizado pelo cálculo da média de absorvância de todos os ensaios, incluindo brancos e controles. A média aritmética da absorbância do branco foi subtraída das médias dos tratamentos com CNBs e dos controles. Os testes foram realizados em triplicata, em quatro ensaios independentes. Também foram realizados ensaios para verificar se os CNBs diluídos em DMSO em sua mais alta concentração seriam diretamente capazes de reduzir o sal de MTT.

O controle positivo (H_2O_2) foi mantido em incubação pelo mesmo período que os tratamentos com CNBs.

Análise do mecanismo de apoptose e necrose por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido que tem sido amplamente utilizada para avaliação dos mecanismos de morte celular. Para tanto, utiliza-se as técnicas de marcação celular pela anexina – V e pelo PI (CROWLEY et al., 2016).

Preparação das amostras e aquisição de dados por citometria de fluxo

As células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura em concentração de $2,5 \times 10^6$ células mL^{-1} , 500 μL /poço, em placas para cultivo celular de 24 poços e incubadas em estufa a 5% CO_2 e 37° C por 24 h. Depois, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com os CNBs diluídos em meio DMEM-C ou DMEM com G418 nas concentrações 15, 30 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o RVT e de 15 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para F-RVT nas células Huh-7.5 e de 1, 15 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para RVT e 1 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para F-RVT nas células SGR-JFH1. O controle de veículo (CV) foi constituído por células em DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura. Os controles de positivos ou controles de morte celular foram constituídos por doxorrubicina (10mg/ml) e H_2O_2 (1 mM). Sendo, a doxorrubicina utilizada como controle de morte por necrose e o H_2O_2 como controle de morte por apoptose.

As células foram então incubadas por 24 horas seguindo as condições descritas anteriormente. Após incubação, as células foram submetidas etapas de separação celular, visando à dissociação celular para evitar a formação de grumos, e de marcação citofluorimétrica. Neste processo, a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células contidas em 100mL de uma solução de anexina V conjugada com FITC na diluição 1:500 diluída em tampão de ligação e iodeto de propídeo (PI, 15mg/mL; Sigma Chemicals, St Louis, USA), com a finalidade de obter uma suspensão celular

adequada para a citometria de fluxo e para o objetivo da análise (CROWLEY et al., 2016).

As células foram incubadas em tubos de propileno, protegidas da luz e mantidos a temperatura ambiente durante 15 minutos. A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) utilizando-se o software Cell Quest iPro para captura dos dados. As populações celulares analisadas foram reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC das mesmas. A fluorescência verde do FITC foi mensurada a $530\pm 30\text{nm}$ (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídeo foi mensurada a $585\pm 42\text{nm}$ (FL2).

As células coradas em verde (anexina-V-FITC) foram consideradas células apoptóticas em estado inicial (apoptose precoce), aquelas coradas em vermelho (PI) foram consideradas células necróticas, as células coradas em verde e vermelho (anexina-V-FITC e PI) foram consideradas células em apoptose tardia e as células viáveis foram aquelas sem nenhuma marcação.

O software Flow Jo foi utilizado para proceder à análise de dados. Foram calculados os índices de apoptose precoce e de necrose para os tratamentos em suas respectivas concentrações. Os índices de apoptose precoce e de necrose foram calculados por meio da divisão da resposta obtida para cada um dos tratamentos, em suas respectivas concentrações, pela resposta obtida para o controle de veículo.

Quantificação de RNA viral

Os ensaios de quantificação de RNA do VHC foram realizados nas células SGR-JFH1 sem tratamento e pós-tratamento com RVT e F-RVT ou controle de veículo, para a determinação do potencial de inibição da replicação viral.

Células sem tratamento

Este estudo foi realizado com a finalidade de determinar a quantidade de RNA viral presente no sobrenadante da cultura celular de SGR-JFH1 no

período inicial de incubação (sobrenadante da cultura celular da garrafa) e após 1 dia e 3 dias de incubação, medido em unidades internacionais por ml (UI mL⁻¹).

Para isto, as células SGR-JFH1 foram plaqueadas em DMEM-C com G418 em concentração de $2,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, 1 mL/poço, em placa para cultivo celular de 24 poços, incubadas em estufa a 37° C e 5% CO₂ pelos períodos de 1 e 3 dias. Após o período de incubação o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos tipo *ependorf* em *freezer* a – 80° C até a etapa de extração e amplificação do RNA viral.

Células pós-tratamento com CNBs

As células SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura em concentração de $5,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, 300 µL/poço, em placas para cultivo celular de 48 poços e incubadas em estufa a 5% CO₂ e 37° C por 24 h. Depois, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com RVT e F-RVT diluídos em meio DMEM-C G418 nas concentrações de 1, 15, 70 e 100 µmol L⁻¹, para RVT e de 0,5, 1 e 15 µmol L⁻¹ para F-RVT e de 0,01, com base nos valores calculados de concentração inibitória a 10% (CI10) e a 20% (CI20), e o controle de veículo (CV), constituído por células em DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura. Devido a ausência de significância estatística entre os períodos de incubação testados (Figura 1), optou-se por manter as células incubadas seguindo as condições descritas anteriormente pelo período de 1 dias.

Decorrido deste período de incubação, os tratamentos foram coletados e armazenados a – 80° C, as placas lavadas com PBS 1 ×, e as células desprendidas da placa por ação de tripsina, seguido pela adição de 200 µL/poço de meio DMEM incompleto. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo *ependorf*, que foram centrifugados em centrífuga Eppendorf 5415D a aproximadamente 300 × *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células armazenado a – 80° C, até o momento da análise, quando 900 µL de tampão de lise foram adicionados.

A metodologia para quantificação do RNA do VHC foi realizada segundo as instruções do fabricante, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., para o ensaio Abbott RealTime VHC e iniciou-se pela extração automática no equipamento Abbott m2000sp, de 600 µL de ácidos nucleicos das amostras de sobrenadante ou células lisadas, empregando micropartículas magnéticas. O controle interno (CI), constituído por uma sequência de RNA sem relação com a sequência alvo do VHC, obtida a partir do gene hidroxipiruvato redutase da abóbora, foi diluído juntamente com o tampão de lise e processado simultaneamente com cada amostra.

Após as etapas de captura do RNA pelas partículas magnéticas e lavagens para remover moléculas não ligadas, o material genético foi eluído e o master mix, constituído por oligonucleotídeos do VHC incluindo sonda e primers, enzima rTth polimerase termoestável e reagente de ativação, foi adicionado. Então, as placas ópticas de reação de 96 poços foram seladas e transferidas ao equipamento Abbott m2000rt para as reações de transcrição reversa, amplificação por reação em cadeia de polimerase, detecção de fluorescência e quantificação de RNA.

Este ensaio segue a padronização da OMS, de acordo com o Segundo Padrão Internacional para RNA do VHC, e apresenta limite de detecção de 12 UI mL⁻¹ e limite superior de quantificação de 100 milhões de UI mL⁻¹. A sequência alvo é a região 5' UTR do genoma do VHC, que é específica e altamente conservada, e os primers são projetados para hibridizar com esta região evitando divergência entre os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Análise estatística

Os dados foram avaliados segundo os pressupostos da normalidade pelo teste de Kolmojorov-Smirnov e homocedasticidade. Em seguida o modelo de análise de variância foi aplicado para verificar o efeito de grupos. O contraste entre médias foi feito pela d.m.s. do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

O RVT e o F-RVT diluídos em DMSO em sua mais alta concentração não apresentaram reatividade (capacidade de reduzir diretamente o sal de MTT) durante o período total do ensaio (dados não apresentados). Os valores de CI_{50} , CI_{20} e CI_{10} estão expressos na Tabela 1.

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

Huh-7.5 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
CBN	CI_{50}	CI_{20}	CI_{10}
RVT	$113,60 \pm 0,16$	$89,86 \pm 0,20$	$92,56 \pm 0,18$
F-RVT	$75,35 \pm 0,20$	$20,10 \pm 0,27$	$32,74 \pm 0,27$
SGR-JFH1 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
CBN	CI_{50}	CI_{20}	CI_{10}
RVT	$171,30 \pm 0,10$	$88,55 \pm 0,15$	$60,19 \pm 0,15$
F-RVT	$22,52 \pm 1,42$	$1,16 \pm 0,66$	$0,21 \pm 0,67$

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de MTT em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após período de incubação de 24h. Resultados expressos em média de triplicata de quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$).

Com base nos valores calculados de concentração inibitória a 10% (CI_{10}), 20% (CI_{20}) e 50% (CI_{50}), foram definidas as concentrações dos CBNs para as etapas posteriores do estudo.

Nas células Huh-7.5 as concentrações foram de 15, 30 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o RVT e de 15 e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ para F-RVT. Nas células SGR-JFH, as concentrações foram de 1, 15 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para RVT e em 1 e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ para F-RVT. A definição desses parâmetros visou a comparação entre os CBNs respeitando as concentrações inibitórias verificadas no ensaio de MTT. Vale salientar, que no ensaio de quantificação da carga viral, além das concentrações citadas acima para as células SGR-JFH, optou-se por testar a concentração de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o RVT, de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o F-RVT.

Na figura 1 apresenta-se a viabilidade celular das linhagens Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com H_2O_2 1 mmol L^{-1} (CP).

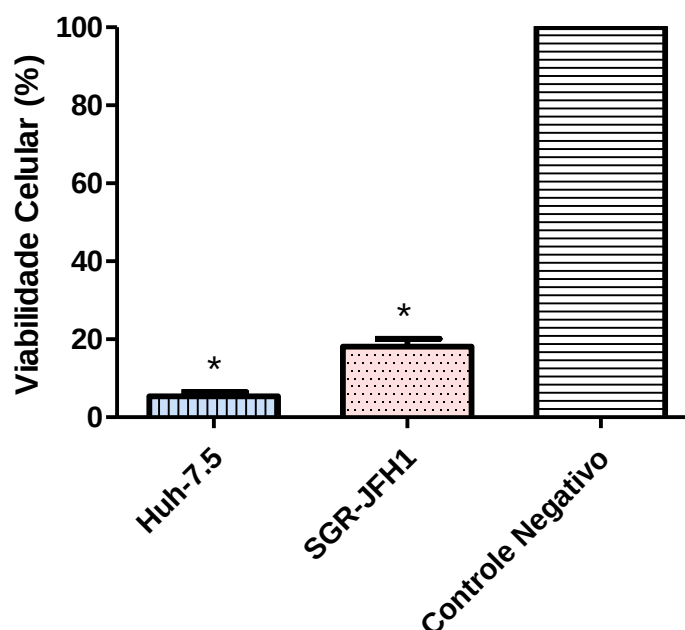


Figura 1. Viabilidade celular das células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com H_2O_2 1 mmol L^{-1} (CP).

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Controle positivo para o ensaio de MTT após período de incubação de 24 h. Resultados expressos como média de quadruplicatas realizadas em três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$); * $p < 0,0001$.

O controle positivo (H_2O_2) apresentou expressiva citotoxicidade. Observa-se que a morte celular nas células SGR-JFH1 foi de aproximadamente 80% e que nas células Huh-7.5, o H_2O_2 apresentou efeito ainda mais drástico, visto que, a viabilidade celular foi de aproximadamente 5%.

Análise do mecanismo de apoptose e necrose por citometria de fluxo

A Figura 2 apresenta o padrão de análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo.

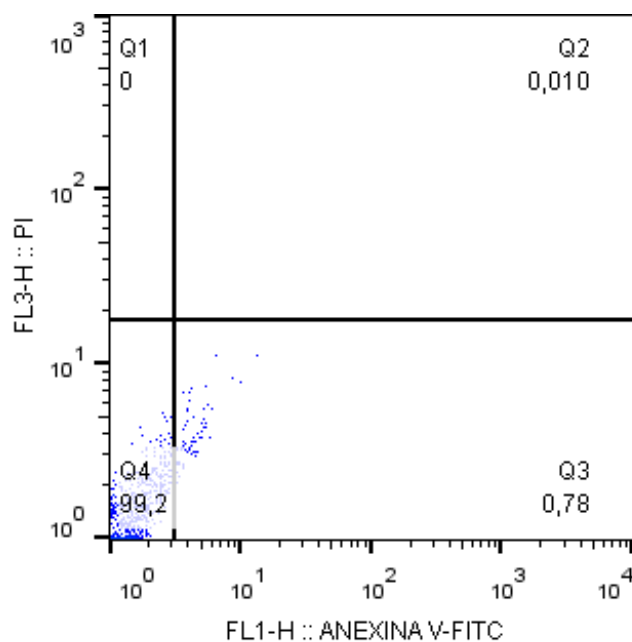
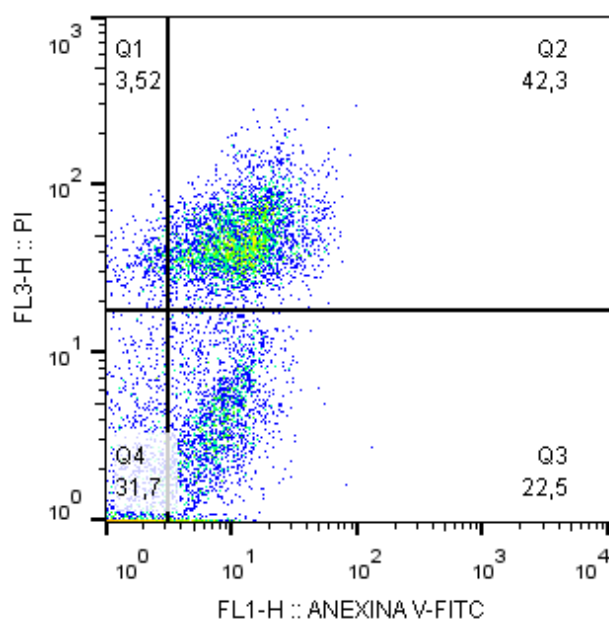
A**B**

Figura 2. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: **(A)** Células SGR-JFH1 (controle de veículo), não marcadas; **(B)** Células SGR-JFH1 pós-tratamento com RVT a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Exemplo de gráfico de pontos em análise por citometria de fluxo. O quadrante 1 (Q1) corresponde à população de células marcadas apenas por PI (PI+V-), consideradas células necróticas; Q2 são células duplamente marcadas por anexina V e PI (PI+V+), que são as células em apoptose tardia; Q3 são

marcadas apenas por anexina V (PI-V+), ou seja, em estágio inicial de apoptose; e Q4 são células não marcadas (PI-V-), ou viáveis.

Na figura 3, apresenta-se o padrão de apoptose precoce em relação ao controle ao controle de Veículo e Controle Positivo constituído por H_2O_2 nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para os CNBs RVT e F-RVT.

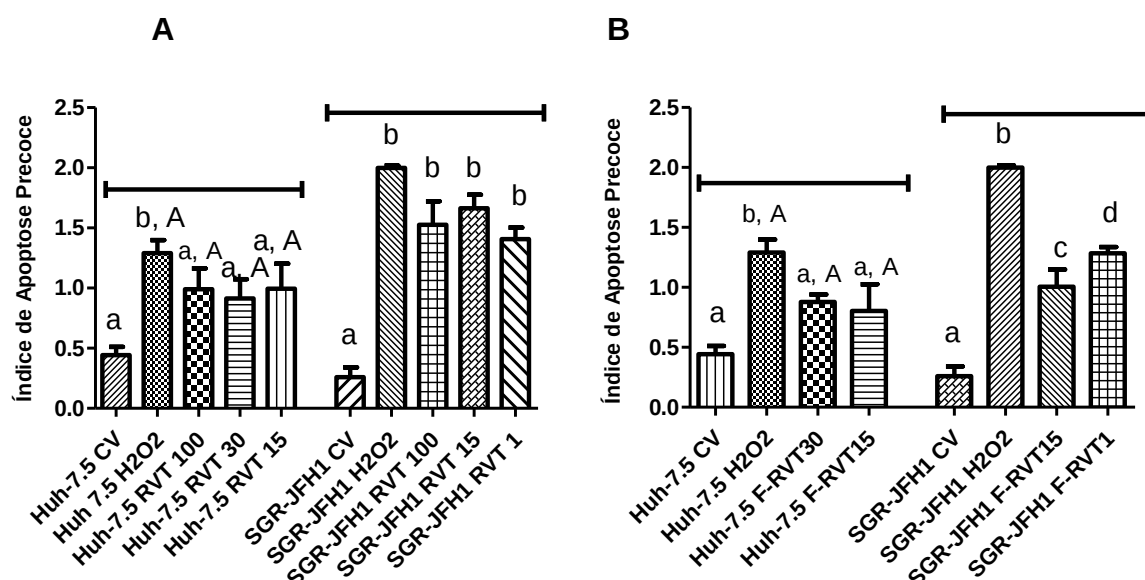


Figura 3. Análise do índice de apoptose precoce em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com resvetratrol e f-resvetratrol.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: (A) Padrão de apoptose precoce em relação ao controle de veículo e ao controle de morte (apoptose) constituído por H_2O_2 nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para o composto resveratrol; (B) Padrão de apoptose precoce em relação ao controle de veículo e ao controle de morte constituído por H_2O_2 nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para o composto f-resveratrol; CV: Controle de Veículo; RVT100: resveratrol a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT30: resveratrol a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT15: resveratrol a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT1: resveratrol a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT30: f-resveratrol a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT15: f-resveratrol a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT1: f-resveratrol a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados expressos como média de duplicatas $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), com os resultados dos períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam similaridade estatística ($p > 0,05$); Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Pode-se observar a tendência à indução de apoptose precoce pelos tratamentos com os CNBs nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as

concentrações testadas. Nas células Huh-7.5 esta indução apresentou níveis similares ao controle de indução de morte (H_2O_2) para os compostos RVT e F-RVT. No entanto, a tendência de indução de demonstrou significância estatística apenas nas células SGR-JFH1 quando comparada ao controle de veículo. Dessa forma, os tratamentos com os compostos nas concentrações testadas, no período observado, exerceram influência significativa sobre a apoptose precoce apenas na linhagem celulares SGR-JFH1. Quando trata-se desta linguagem celular, pode-se perceber ainda que o CNB F-RVT da concentração de a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou maior potencial de indução de apoptose precoce em comparação as demais concentrações para cada um dos CNBs.

Na figura 4, apresenta-se o padrão de apoptose precoce em relação ao controle ao Controle de Veículo e Controle Positivo constituído por doxorrubicina nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para os CNBs RVT e F-RVT, respectivamente.

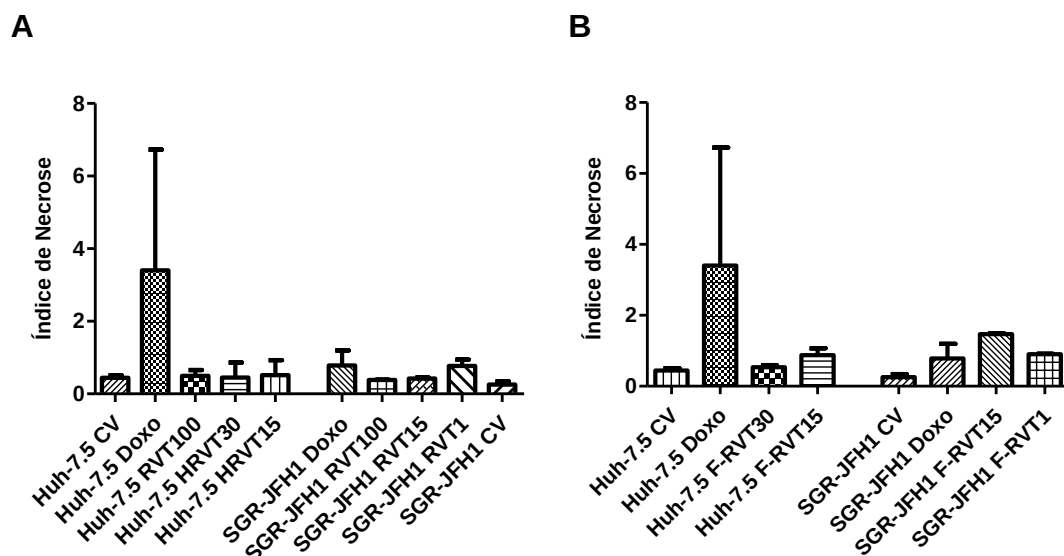


Figura 4. Análise do índice de necrose em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com resveratrol e f-resvaratrol.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: **(A)** Padrão de necrose em relação ao controle de veículo e ao controle de morte constituído por doxorrubicina nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para o composto resveratrol; **(B)** Padrão de necrose em relação ao controle de veículo e ao controle de morte constituído por doxorrubicina nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para o composto f-

resveratrol. CV: controle de veículo; Doxo: doxorubicina RVT100: resveratrol a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT30: resveratrol a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT15: resveratrol a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT1: resveratrol a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT30: f-resveratrol a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT15: f-resveratrol a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT1: f-resveratrol a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados expressos como média de duplicatas $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), com os resultados dos períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA.

Observa-se ausência de influencia dos tratamentos com os CNBs sob o padrão de necrose nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as concentrações.

Quantificação de RNA viral

A figura 5 apresenta o ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) para determinação da carga viral de RNA do VHC em células SGR-JFH1 antes da incubação e nos períodos de incubação de 1 dia e 3 dias.

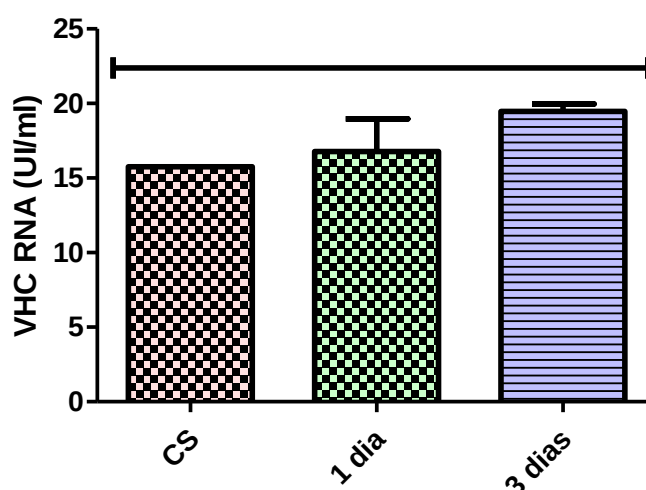


Figura 5. Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC em sobrenadante de células SGR-JFH1.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para determinação da carga viral de RNA do VHC em células SGR-JFH1 no períodos de incubação 1 dia e 3 dias. O sobrenadante da garrafa de cultura celular previamente ao plaqueamento foi empregado como controle (CS) de carga viral inicial. Resultados expressos como média de duplicatas $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), com os resultados dos períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA.

Observa-se que, considerando como referência a carga viral inicial do sobrenadante (CS) da cultura celular em garrafa antes do plaqueamento, o RNA viral quantificado no 1º dia e 3º dia de incubação das células SGR-JFH1 não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Na figura 6 apresenta-se análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC em meio intracelular e sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com CNBs em diferentes concentrações após 1 dia de incubação.

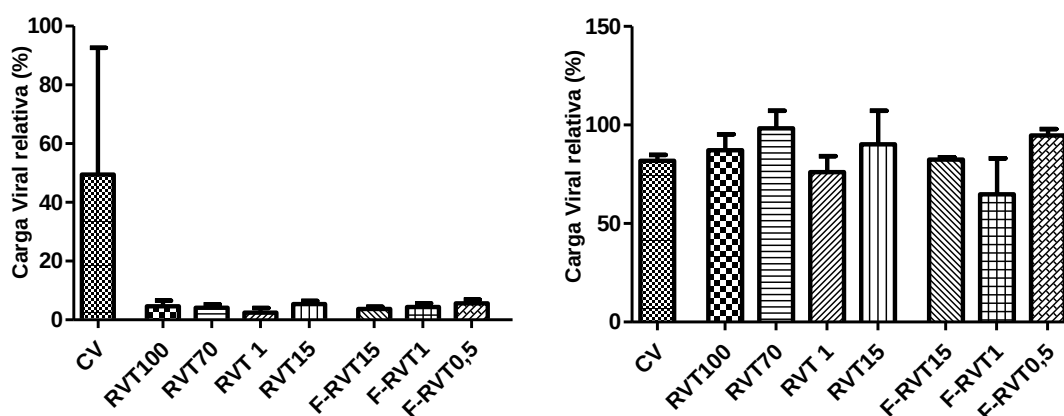


Figura 6. Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC meio intracelular e no sobrenadante de células SGR-JFH1.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para quantificação de RNA do VHC, com resultado em carga viral relativa (%) calculado a partir da carga viral de cada tratamento (UI mL^{-1}) em relação ao CV, realizado em células SGR-JFH1. **A:** carga viral intracelular após período de incubação de, 1 dia em tratamentos com os CNBs. **B:** carga viral no sobrenadante da cultura celular após incubação 1 dia em tratamentos com os CNBs. Resultados expressos como média de duplicatas $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), com os períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA. CV: Controle de Veículo; RVT100: resveratrol a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT70: resveratrol a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT15: resveratrol a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; RVT1: resveratrol a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT15: f-resveratrol a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT1: f-resveratrol a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; F-RVT0,5: f-resveratrol a 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Nota-se redução da carga viral intracelular como efeitos dos tratamentos com RVT e F-RVT em 1 dia em tratamentos. Quando se considera, no entanto a carga viral extracelular percebe-se ausência de

influencia de significativa RVT e F-RVT sobre a carga viral durante o período de incubação verificado.

Discussão

Os processos de morte celular podem ser classificados em necrose ou apoptose. A apoptose é caracterizada pela compactação da célula em um processo ordenado que inclui a diminuição celular, a picnose e o surgimento de corpos apoptóticos. A necrose, por sua vez, ocorre em virtude de lesão e caracteriza-se pela ruptura de membrana plasmática e pelo aumento do núcleo celular e da célula como um todo (CROWLEY et al., 2016). O processo de avaliação do mecanismo de apoptose e necrose por citometria de fluxo com anexina V conjugada a FITC e PI baseia-se nas características da membrana plasmática.

A membrana plasmática celular é composta por lipídios assimetricamente distribuídos em uma camada externa e outra interna, direcionadas para o ambiente extracelular e para o citosol, respectivamente. A fosfatidilserina é um fosfolipídio restrito à interface interna da membrana de células íntegras, contudo, a desorganização da membrana que ocorre no processo inicial de apoptose provoca a translocação e consequente exposição da fosfatidilserina ao ambiente externo, facilitando sua ligação à anexina V conjugada a FITC, com emissão de fluorescência verde. Em contrapartida, no processo de necrose ocorre a perda da integridade da membrana e não apenas desorganização de sua estrutura. A membrana torna-se permeável, então o PI pode adentrar a célula e intercala-se ao DNA, indicando o processo necrótico a partir da emissão de fluorescência vermelha (CROWLEY et al., 2016).

A capacidade de sofrer apoptose é intrínseca a muitas células, pois, este processo é método convencional e geral de remover células que não devem mais fazer parte do organismo por diferentes motivos. Entre os motivos para a ocorrência de apoptose podemos citar a necessidade de organização de tecido em órgão, de manutenção da homeostase do organismo (remoção de algumas células para substituição por novas), de

desenvolvimento da resposta imune e de deleção de células anormais como potencial danoso ao organismo (células infectadas com vírus e/ou com danos no DNA) (OLIVEIRA et al. 2020).

Tratando especificamente desde ultimo caso, as células infectadas com vírus ou com danos no DNA desencadearam a resposta imune para tentativa de eliminação viral e a tentativa de reparação do dano ao DNA, no entanto, caso estas tentativas sejam frustradas, estas células entraram em processo de apoptose, na tentativa de eliminação da infecção e de exclusão da possibilidade de progressão do crescimento celular a partir do DNA danificado, respectivamente (CROWLEY et al., 2016). A alta prevalência de evolução natural da infecção pelo VHC para a cronicidade (55 a 85% dos casos), de progressão da doença para cirrose (5 a 20% dos infectados) e ocorrência de óbitos carcinoma hepatocelular e cirrose provocados pela infecção (1 a 5% dos óbitos dos infectados), sugerem que o HVC apresenta mecanismos de evasão dos processos de sinalização de apoptose, como tentativa de eliminação da infecção e de eliminação da progressão do crescimento de células com dano celular (BURKE & COX, 2010; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Nossos resultados sugerem que o RVT e F-RVT apresentam potencial interessante na modulação da morte celular com ativação de vias relacionadas a apoptose, pois os tratamentos com diferentes concentrações dos compostos aumentaram a apoptose sem afetar (elevar) a necrose tanto nas células Huh-7.5, quando nas SGR-JFH1. Este efeito é bastante positivo, pois evita dano tecido e indução de estresse oxidativo. Este resultado demonstra que o potencial antitumoral do RVT relacionada à capacidade de indução de apoptose e ao seu potencial antioxidante tem sido descrita na literatura (GAMBINI et al., 2015; KULKARNI & CANTÓ, 2015) aplica-se para as células Huh-7.5 e para infecção pelo VHC in vitro (SGR-JFH1). Assim, acreditamos que os mecanismos de ação do RVT e do F-RVT podem estar relacionados a redução da proliferação de células infectadas ou com dano

de DNA pela sinalização para fagocitose e/ou pela interrupção do ciclo celular (SPAGNUOLO et al., 2019).

A avaliação da carga viral no meio intra e extracelular, por sua vez, demonstra que os compostos apresentaram potencial de redução de carga viral intracelular no período de incubação avaliado (1 dia), mas que este perfil não se manteve para a carga viral em meio extracelular deste modo sugere-se prolongamento de tempo de avaliação dos tratamentos para verificar a repercussão da redução da carga viral no meio intracelular sobre o meio extracelular em período mais prolongado. A necessidade de ênfase nos estudos sobre os efeitos do RVT reforça-se quando leva-se a discordância de autores sobre a ação deste composto sobre a replicação viral, pois, 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).

Conclusão

Observou-se potencial apoptótico significativo dos compostos nas células Huh-7.5 e SGR-JFH1 em todas das concentrações testadas, o que sugere efeito antitumoral do RVT e do F-RVT. Além disso, observou-se influência dos compostos sob a carga viral intra de VHC no período de incubação avaliado.

Referências

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.

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.

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.

CROWLEY, L. C. et al. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. 647–651, 2016.

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.

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

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.

GONÇALVES, D. et al. Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitisC under antiviral Therapy. **Food & Nutrition Research.** v. 61, n. 12966, p. 1-10, 2017. dx.doi.org/10.1080/16546628.2017.1296675.

JARDIM, A.C.G. et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral Res.** v, 115, p. 39-47, 2015

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.

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.

OLIVEIRA J.M.P.F. et al. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. **Phytomedicine.** v. 73, p. 152887, 2020.

SEREN, S. et al. Potential Role of Lycopene in the Treatment of Hepatitis C and Prevention of Hepatocellular Carcinoma. **Nutr Cancer.** v. 60, n. 6, p. 729-35, 2008

SHERIFF, S. A. et al. Lycopene stabilizes liver function during d-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatitis in rats. **J Taibah Univ Sci.** v. 7, n.1, p. 8-16, 2013.

SPAGNUOLO C. et al. A Phenolic Extract from Extra Virgin Olive Oil

Induces Authophagy and Apopotosis in Human Bladder Cancer Cell Lines Depending on Tumor Progression. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 29, n.8, p. 871, 2019.

SONG D, et al. Short and Scalable Total Synthesis of Myrioneuron Alkaloids ($\pm$)- α,β -Myrifabral A and B. **Org Lett**. v. 18, n. 4, p. 669-71, 2016.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British journal of cancer**, v. 56, p. 279–285, 1987.

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.

Capítulo 4.

**Avaliação do potencial antioxidante da taurina sob a modulação
da morte celular e replicação do vírus da hepatite C**

Redigido para ser enviado à revista

ANTIOXIDANTS (ISSN: 2076-3921; QUALIS/CAPES - CIÊNCIAS

ALIMENTOS: C).

Avaliação do potencial antioxidante da taurina sob a modulação da morte celular e replicação do vírus da hepatite C

Moema Souza Santana¹, Rute Lopes², Chung Man Chin³ and Paulo Inácio da Costa^{1*}

¹Food and Nutrition Department, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

²Department of Biotechnology, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

³Department of Pharmaceutical and Medication, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, Brazil.

*Author for correspondence. E-mail: costapi.unesp@gmail.com

Resumo

Introdução: A taurina (TAU) ou ácido 2-aminoetanossulfônico, aminoácido condicionalmente essencial que contem enxofre e deriva-se dos aminoácidos cisteína e metionina, não participa da síntese proteica, no entanto, destacando-se pelo desempenho de funções fisiológicas como potencial antioxidante e anti-inflamatório, papel estabilidade da membrana plasmática, na reprodução, na imunidade. Considerando o a ampla atividade biológica da TAU acredita-se que este aminoácido apresente capacidade de modificar o perfil de morte celular e de interferir sobre a replicação viral o vírus da hepatite C (VHC). **Objetivo:** Avaliar o efeito da TAU sobre o perfil de morte celular (apoptose precoce e necrose) e a replicação do VHC em células Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1. **Métodos:** Utilizou-se células Huh-7.5 e células Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1 para realização do trabalho. A análise de viabilidade das células foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de MTT. Análise do mecanismo de apoptose e necrose foi realizada por citometria de fluxo. A quantificação de RNA do VHC foi realizado nas células SGR-JFH1 sem tratamento e pós-tratamento com TAU. Aplicou-se o modelo de análise de variância. O contraste entre médias foi feito pela d.m.s. do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. **Resultados:** O controle positivo (H₂O₂) apresentou expressiva citotoxicidade, morte celular aproximadamente 80% nas células SGR-JFH1 e de 95% nas células Huh-7.5. A TAU apresentou potencial de indução de apoptose precoce nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as concentrações testadas. Houve ausência de influencia da TAU sob o padrão de necrose nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1. Verificou-se ainda redução da carga viral intracelular como efeitos dos tratamentos com TAU em 1 dia em tratamentos e ausência de influência na carga viral extracelular no mesmo período. **Conclusão:** A TAU apresentou efeito sobre a indução de apoptose precoce em células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 e sobre a redução da carga viral intracelular do VHC.

Palavras-Chave: Taurina, Apoptose, Necrose, Citotoxicidade, Carga Viral.

Introdução

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 grupamento sulfônico (-SO₃) ao invés do grupamento carboxílico (COOH) (IKUBO et al., 2011).

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). Considerando o a ampla atividade biológica da TAU acredita-se que este aminoácido apresente capacidade de modificar o perfil de morte celular e de interferir sobre a replicação viral o vírus da hepatite C (VHC). Deste modo o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da TAU sobre o perfil de morte celular (apoptose precoce e necrose) e a replicação do VHC em células Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1.

Material e Métodos

Neste trabalho foram utilizadas células da linhagem Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR-JFH1 cedidas

pela Profa. Dra. Paula Rahal do Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, com autorização da detentora das linhagens, "Apath L.L.C.". O acordo de transferência de material acadêmico foi documentado sob o número 1590 (linhagem celular Huh-7.5) e 1591 (APP1022 pSGR-JFH1), ao orientador deste trabalho, Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR)- UNESP/Araraquara.

Cultura celular

As células Huh-7.5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM - Sigma D1152 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% solução de aminoácidos não-essenciais, penicilina 10.000 U mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹ (meio de cultura completo – DMEM-C). As células SGR-JFH1 com gene de resistência à neomicina foram cultivadas em meio DMEM-C contendo 500 µg mL⁻¹ de geneticina (G418). As células foram mantidas em estufa umidificada com 5% CO₂ a 37° C, com troca do meio de cultura a cada dois dias. A coleta de células foi realizada quando alcançada a concentração necessária para a realização dos experimentos com solução de tripsina EDTA - Sigma T4049 0,25% em solução salina de Hanks. A contagem de células foi realizada por coloração com azul de Trypan 0,2% (m/v) em PBS, em câmara de Neubauer.

Análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A análise de viabilidade das células para determinar a concentração em que TAU apresentou citotoxicidade às células e para calcular a concentração inibitória média (CI₅₀) realizou-se ensaio colorimétrico de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987). Assim, as suspensões de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram preparadas em meio de cultura em concentração de $2,5 \times 10^5$ células mL⁻¹, em placa de cultura celular de 96 poços de fundo plano, distribuídas em volume de 100 µL/poço, incubadas em estufa umidificada a

5% CO₂ e 37° C por 24 h. O meio de cultura foi removido, após o período de incubação, e as células tratadas com os CNBs concentrações de 3,9 a 2000 µmol L⁻¹ de TAU. As células foram novamente incubadas por 24 h, nas condições anteriormente descritas. Então, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com PBS 1 ×. Adicionou-se 100 µL/ poço de solução de MTT a 2 mg mL⁻¹ em meio DMEM incompleto. A placa foi incubada novamente por um período de 3 h. A solução de MTT foi então removida e foram pipetados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma D4540). As placas foram então mantidas em agitação por 5 min em temperatura ambiente e ao abrigo de luz e a leitura de absorbância realizada em espectrofotômetro de microplaca a 490 nm com filtro de referência em 630 nm.

O controle positivo (CP) de morte celular constituiu-se por células em meio de cultura contendo 1 mmol L⁻¹ de H₂O₂; o branco por DMEM; o controle negativo (CN), considerado 100% da viabilidade celular (VC), por células incubadas apenas em meio de cultura completo; o controle de viabilidade celular empregou as células em meio de cultura contendo DMSO 1% (v/v), representando a concentração máxima utilizada na diluição dos CNBs. O cálculo das concentrações inibitórias (CI₅₀, CI₂₀ e CI₁₀) foi realizado pelo cálculo da média de absorvância de todos os ensaios, incluindo brancos e controles. A média aritmética da absorbância do branco (*Branco*) foi subtraída das médias dos tratamentos com CNBs e dos controles. Os testes foram realizados em triplicata, em quatro ensaios independentes. Além disso, realizou-se ensaio para verificar se a TAU diluída em DMSO em sua mais alta concentração seriam diretamente capazes de reduzir o sal de MTT. O controle positivo (H₂O₂) foi mantido em incubação pelo mesmo período que os tratamentos com CNBs.

Quantificação de RNA viral

Os ensaios de quantificação de RNA do VHC foram realizados nas células SGR-JFH1 sem tratamento e pós-tratamento com TAU ou controle de veículo, para a determinação do potencial de inibição da replicação viral.

Células sem tratamento

Estudo realizado com o objetivo de determinar a quantidade de RNA viral presente no sobrenadante da cultura celular de SGR-JFH1 no período inicial de incubação (sobrenadante da cultura celular da garrafa) e após 1 dia e 3 dias de incubação, medido em unidades internacionais por ml (UI mL⁻¹). Para isto, as células SGR-JFH1 foram plaqueadas em DMEM-C com G418 em concentração de $2,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, 1 mL/poço, em placa para cultivo celular de 24 poços, incubadas em estufa a 37° C e 5% CO₂ pelos períodos de 1 e 3 dias. Após o período de incubação o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos tipo *ependorf* em *freezer* a – 80° C até a etapa de extração e amplificação do RNA viral, de acordo com a metodologia descrita no item seguinte para as células com tratamento.

Células pós-tratamento com CNBs

As células SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura em concentração de $5,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, 300 µL/poço, em placas para cultivo celular de 48 poços e incubadas em estufa a 5% CO₂ e 37° C por 24 h. Depois, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com os CNBs diluídos em meio DMEM-C G418 nas concentrações de 0,01, 1 e 15 de TAU, com base nos valores calculados de concentração inibitória a 10% (CI10) e a 20% (CI20), e o controle de veículo (CV), constituído por células em DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura. Optou-se por manter as células incubadas seguindo as condições descritas anteriormente pelo período de 1 dias (ausência de diferença estatisticamente significativamente entre os períodos de avaliação testados). Decorrido deste período de incubação, os tratamentos foram coletados e armazenados a – 80° C, as placas lavadas com PBS 1 ×, e as células desprendidas da placa por ação de tripsina, seguido pela adição de 200 µL/poço de meio DMEM incompleto. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo *ependorf*, que foram centrifugados em centrífuga Eppendorf 5415D a aproximadamente $300 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células

armazenado a -80°C , até o momento da análise, quando 900 μL de tampão de lise foram adicionados.

A metodologia para quantificação do RNA do VHC foi realizada segundo as instruções do fabricante, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., para o ensaio Abbott RealTime VHC e iniciou-se pela extração automática no equipamento Abbott m2000sp, de 600 μL de ácidos nucleicos das amostras de sobrenadante ou células lisadas, empregando micropartículas magnéticas. O controle interno (CI), constituído por uma sequência de RNA sem relação com a sequência alvo do VHC, obtida a partir do gene hidroxipiruvato redutase da abóbora, foi diluído juntamente com o tampão de lise e processado simultaneamente com cada amostra. Após as etapas de captura do RNA pelas partículas magnéticas e lavagens para remover moléculas não ligadas, o material genético foi eluído e o master mix, constituído por oligonucleotídeos do VHC incluindo sonda e primers, enzima rTth polimerase termoestável e reagente de ativação, foi adicionado. Então, as placas ópticas de reação de 96 poços foram seladas e transferidas ao equipamento Abbott m2000rt para as reações de transcrição reversa, amplificação por reação em cadeia de polimerase, detecção de fluorescência e quantificação de RNA. Este ensaio segue a padronização da OMS, de acordo com o Segundo Padrão Internacional para RNA do VHC, e apresenta limite de detecção de 12 UI mL^{-1} e limite superior de quantificação de 100 milhões de UI mL^{-1} . A sequência alvo é a região 5' UTR do genoma do VHC, que é específica e altamente conservada, e os primers são projetados para hibridizar com esta região evitando divergência entre os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Análise do mecanismo de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Utilizou-se a citometria de fluxo para avaliação dos mecanismos de morte celular. Para tanto, utiliza-se as técnicas de marcação celular pela anexina – V e pelo PI (CROWLEY et al., 2016).

Preparação das amostras e aquisição de dados por citometria de fluxo

As células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura em concentração de $2,5 \times 10^6$ células mL^{-1} , 500 μL /poço, em placas para cultivo celular de 24 poços e incubadas em estufa a 5% CO_2 e 37° C por 24 h. Depois, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com os CNBs diluídos em meio DMEM-C G418 nas concentrações de TAU 15 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para células Huh-7.5 e de 1 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para células SGR-JFH1. O controle de veículo (CV) foi constituído por células em DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura. Os controles de positivos ou controles de morte celular foram constituídos por doxorrubicina (10mg/ml) e H_2O_2 (1 mM). Sendo, a doxorrubicina utilizada como controle de morte por necrose e o H_2O_2 como controle de morte por apoptose.

As células foram então incubadas por 24 horas seguindo as condições descritas anteriormente. Após incubação, as células foram submetidas etapas de separação celular, visando à dissociação celular para evitar a formação de grumos, e de marcação citofluorimétrica. Neste processo, a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células contidas em 100mL de uma solução de anexina V conjugada com FITC na diluição 1:500 diluída em tampão de ligação e iodeto de propídeo (PI, 15mg/mL; Sigma Chemicals, St Louis, USA), com a finalidade de obter uma suspensão celular adequada para a citometria de fluxo e para o objetivo da análise. (CROWLEY et al., 2016).

As células foram incubadas em tubos de propileno, protegidas da luz e mantidos a temperatura ambiente durante 15 minutos. A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) utilizando-se o software Cell Quest iPro para captura dos dados. As populações celulares analisadas foram reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC das mesmas. A fluorescência verde do FITC foi mensurada a $530 \pm 30\text{nm}$ (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídeo foi mensurada a $585 \pm 42\text{nm}$ (FL2). As células coradas em verde (anexina-V-FITC) foram consideradas células apoptóticas em estado inicial (apoptose precoce), aquelas coradas em vermelho (PI) foram consideradas

células necróticas, as células coradas em verde e vermelho (anexina-V-FITC e PI) foram consideradas células em apoptose tardia e as células viáveis foram aquelas sem nenhuma marcação. O software Flow Jo foi utilizado para proceder à análise de dados. Foram calculados os índices de apoptose precoce e de necrose para todos os tratamentos em suas respectivas concentrações. Os índices de apoptose precoce e de necrose foram calculados por meio da divisão da resposta obtida para cada um dos tratamentos, em suas respectivas concentrações, pela resposta obtida para o controle de veículo.

Análise estatística

Os dados foram avaliados segundo os pressupostos da normalidade pelo teste de Kolmojorov-Smirnov e homocedasticidade. Em seguida o modelo de análise de variância foi aplicado para verificar o efeito de grupos. O contraste entre médias foi feito pela d.m.s. do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A taurina diluída em DMSO em sua mais alta concentração não apresentou reatividade (capacidade de reduzir diretamente o sal de MTT) durante o período total do ensaio (dados não apresentados). Os valores de CI_{50} , CI_{20} e CI_{10} estão expressos na tabela 1.

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

Linhagem Celular	CI_{50}	CI_{20}	CI_{10}
Huh-7.5 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	7,27 $\pm$ 1,00	16,26 $\pm$ 0,22	26,02 $\pm$ 0,55
SGR-JFH1 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,002 $\pm$ 0,01	0,007 $\pm$ 0,01	0,013 $\pm$ 0,01

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de MTT em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após período de incubação de 24h. Resultados expressos em média de triplicata de quatro experimentos independentes $\pm$ erro padrão (M $\pm$ EP).

Com base nos valores calculados de concentração inibitória a 10% (CI10), 20% (CI20) e 50% (CI50), foram definidas as concentrações dos CBNs para as etapas posteriores do estudo. Nas células Huh-7.5 as concentrações de TAU foram de 15 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nas células SGR-JFH, as concentrações foram de 1 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para para TAU. Vale salientar, que no ensaio de quantificação da carga viral, além das concentrações citadas acima para as células SGR-JFH, testou-se ainda a concentração de TAU de 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O controle positivo (H_2O_2) apresentou expressiva citotoxicidade. Nas células SGR-JFH1 a morte celular foi de aproximadamente 80% e que nas células Huh-7.5 de 95%, ou seja, o efeito citotóxico do H_2O_2 mais intenso sobre esta linhagem celular.

Quantificação de RNA viral

O ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) para determinação da carga viral de RNA do VHC em células SGR-JFH1 antes da incubação indicou ausência de diferença estatisticamente significativa no quantitativo de RNA viral do sobrenadante no 1º dia e 3º dia de incubação. Na figura 1 apresenta-se análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC em meio intracelular e sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com TAU em diferentes concentrações após 1 dia de incubação.

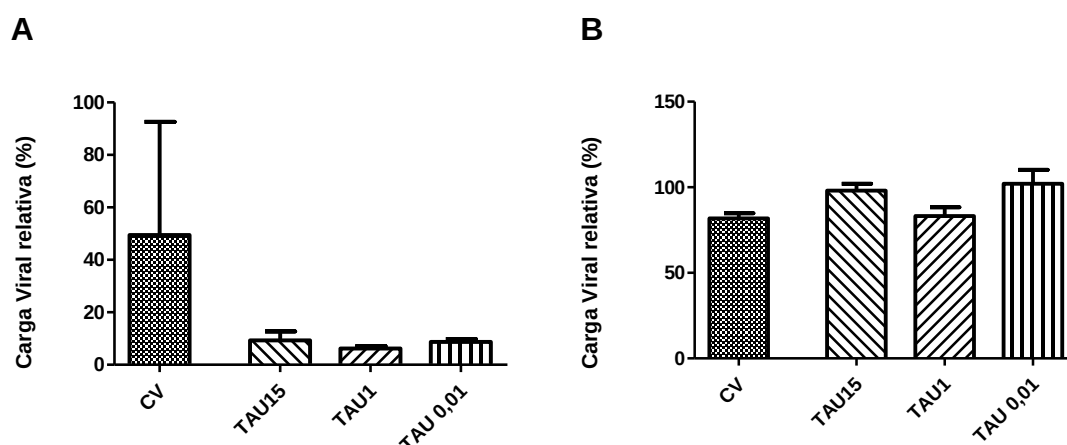


Figura 1. Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral de RNA do VHC meio intracelular e no sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com taurina.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para quantificação de RNA do VHC, com resultado em carga viral relativa (%) calculado a partir da carga viral de cada tratamento (UI mL⁻¹) em relação ao CV, realizado em células SGR-JFH1. **A:** carga viral intracelular após período de incubação de, 1 dia em tratamentos com TAU. **B:** carga viral no sobrenadante da cultura celular após incubação 1 dia em tratamentos com TAU. Resultados expressos como média de duplicatas ± erro padrão (M±EP), com os períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA. CV: Controle de Veículo; TAU15: taurina 15 µmol L⁻¹; TAU1: taurina 1 µmol L⁻¹; TAU0,1: taurina a 0,1 µmol L⁻¹.

Observa-se influencia da taurina sobre a redução da carga viral intracelular, no entanto, o padrão de redução não se mantém no que diz respeito a carga viral extracelular no período de incubação verificado.

Análise do mecanismo de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Na figura 2, apresenta-se o padrão de apoptose precoce em relação ao controle ao controle de Veículo e Controle Positivo constituído por H₂O₂ nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 tratadas com TAU em diferentes concentrações.

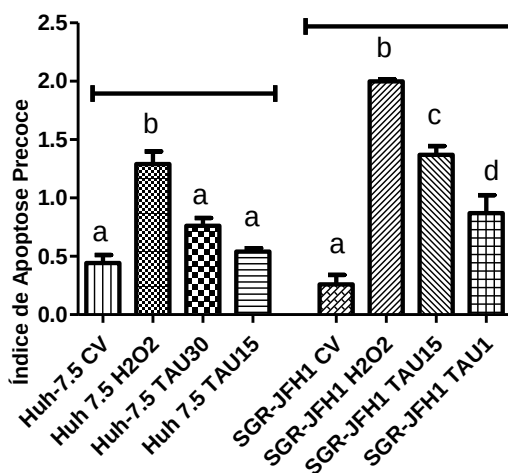


Figura 2. Análise do índice de apoptose precoce em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com taurina.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Padrão de apoptose precoce em relação ao controle de veículo e ao controle de morte constituído por H₂O₂ nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para o composto taurina. CV: Controle de Veículo; TAU30: taurina 30 µmol L⁻¹; TAU15: taurina 15 µmol L⁻¹; TAU1:

Taurina a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados expressos como média de duplicatas $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), com os resultados dos períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam similaridade estatística ($p > 0,05$); Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Pode-se observar a tendência à indução de apoptose precoce pelos tratamentos com os CNBs nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as concentrações testadas. Dessa forma, a Tau exerceu influência significativa sobre apoptose precoce em ambas as linhagens celulares, sendo que, nas SGR-JFH1 a concentração de TAU a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, apresentaram maior potencial de indução de apoptose precoce.

Na figura 3, apresenta-se o padrão de apoptose precoce em relação ao controle ao Controle de Veículo e Controle Positivo constituído por doxorrubicina nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 em relação ao tratamento com TAU.

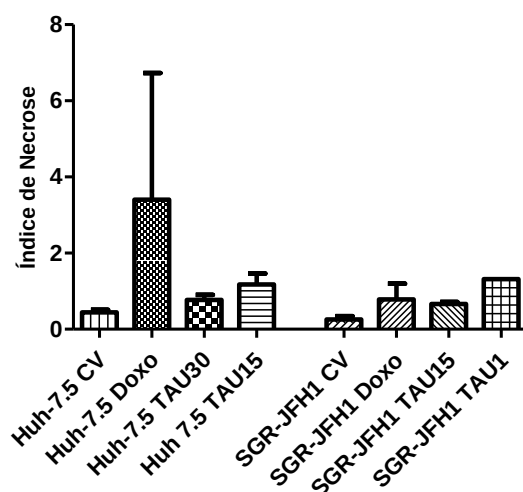


Figura 3. Análise do índice de necrose em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com taurina.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Padrão de necrose em relação ao controle de veículo e ao controle de morte constituído por doxorrubicina nas células HUH-7.5 e SGR-JFH1 para taurina. CV: controle de veículo; Doxo: doxorrubicina; TAU30: taurina 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$; TAU15: taurina 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; TAU1: Taurina a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados expressos como média de duplicatas $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), com os resultados dos períodos de incubação analisados por *one-way* ANOVA.

Observa-se ausência de influencia dos tratamentos com os CNBs sob o padrão de necrose nas células Huh-7.5 e nas SGR-JFH1 para as concentrações.

Discussão

Os resultados sugerem que o TAU apresenta potencial interessante na modulação da morte celular com ativação de vias relacionadas a apoptose sem afetar (elevar) a necrose tanto nas células Huh-7.5, quando nas SGR-JFH1. Este efeito é bastante positivo, pois evita o dano tecido e a indução de estresse oxidativo. Acredita-se que este resultado envolva potencial biológico de estabilização de membranas celulares (ação relevante sobre a fluidez, a capacidade de transporte de alguns íons, a regulação da atividade de algumas enzimas, manutenção do potencial de membrana e do pH intracelular) e de ação antioxidante e anti-inflamatória da TAU, relacionado principalmente a estrutura química que difere das dos desde aminoácidos presença de um grupamento sulfônico (-SO₃) ao invés do grupamento carboxílico (COOH).

O papel da TAU sobre as membranas justifica-se pela interação que este aminoácido estabelece com os fosfolipídios de membrana, como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina devido o grupamento sulfônico que a TAU apresenta (GUIZOUARN et al., 2000) e ação antioxidante e anti-inflamatória, também relaciona-se a presença grupamento sulfônico da TAU, pois, este é capaz de promover a conversão de íon cloro e ácido hipocloroso, substâncias altamente citotóxicas e oxidantes, em cloramina, uma substancia relativamente estável, promovendo homeostase e impedindo danos ao DNA (SUN et al, 2012).

A avaliação da carga viral no meio intra e extracelular, por sua vez, demonstra que a TAU apresentou potencial de redução de carga viral intracelular no período de incubação avaliado (1 dia), mas que este perfil não se manteve para a carga viral em meio extracelular deste modo sugere-se prolongamento de tempo de avaliação dos tratamentos para verificar a

repercussão da redução da carga viral no meio intracelular sobre o meio extracelular em período mais prolongado.

Conclusão

Observou-se influência dos CBNs das concentrações estudadas sob a carga viral intracelular de VHC no período de incubação avaliado e observou-se potencial apoptótico significativo dos compostos nas células SGR-JFH1 em todas das concentrações testadas, o que sugere efeito antitumoral da TAU na linguagem SGR-JFH1.

Referências

CROWLEY, L. C. et al. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. 647–651, 2016.

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

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

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

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British journal of cancer**, v. 56, p. 279–285, 1987.

SUN, M. et al. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. **Scand J Med Sci Sports**. v. 22, n. 6, p. 764-75, 2012.

Guizouarn, H et al. Cell volume regulation: The role of taurine loss in maintaining membrane potential and cell pH. **J of Physiol**. v. 523, p. 147-154, 2000.

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 CBNs, 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.