

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/10/2021.

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

RUTE LOPES

**Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no
metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação
com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células
expressando o SGR-JFH1**

TESE DE DOUTORADO

**Araraquara - SP
2019**

RUTE LOPES

**Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no
metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação
com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células
expressando o SGR-JFH1**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Minarelli Gaspar
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

**Araraquara - SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

L864e Lopes, Rute
Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células expressando o SGR-JFH1 / Rute Lopes. – Araraquara : [s.n.], 2019
119 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Ana Maria Minarelli Gaspar
Coorientador: Paulo Inácio da Costa

1. Hepatite C. 2. Células hepáticas. 3. Compostos bioativos. 4. Produtos naturais. 5. Flavonoides. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

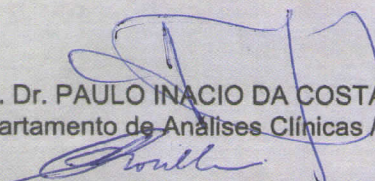
TÍTULO DA TESE: "Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células expressando o SGR-JFH1"

AUTORA: RUTE LOPES

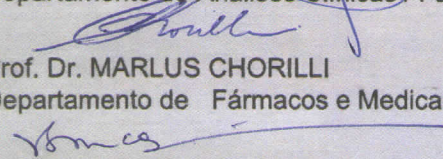
ORIENTADORA: ANA MARIA MINARELLI GASPAR

COORDENADOR: PAULO INACIO DA COSTA

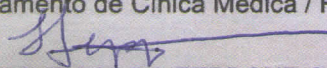
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA

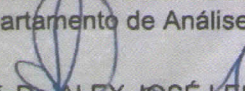
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

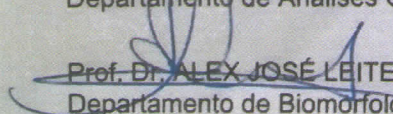
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof.ª Dr.ª MARIA INES DE MOURA CAMPOS PARDINI

Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - Botucatu


Prof.ª Dr.ª IRACILDA ZEPPONE CARLOS

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ALEX JOSÉ LEITE TORRES

Departamento de Biomorfologia / Universidade Federal da Bahia - UFBA - Salvador

Araraquara, 03 de outubro de 2019

Dados Curriculares

Nome: Rúte Lopes

Nome em citações bibliográficas: LOPES, R.

Resumo das qualificações: Mestrado em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase no desenvolvimento de biomateriais, Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA (2012), Bacharel em Comunicação Audiovisual: Imagem e Som pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2004).

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2015 – 2019	Doutorado em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química de Araraquara. Título: Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células expressando o SGR-JFH1. Orientadora: Prof. ^a Dr. ^a Ana Maria Minarelli Gaspar. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa. Bolsista CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
2013 – 2015	Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química de Araraquara. Título: Funcionalização de Celulose Bacteriana com Peptídeo RGD para Reparação Tecidual de Pele. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Coorientadora: Dra. Sybele Saska Specian. Bolsista CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
2009 - 2012	Bacharelado em Biomedicina Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara. Título: Incorporação de Complexo Metálico de Ouro-Mercaptotiazolina em Membrana de Celulose Bacteriana para uso em Medicina. Orientador: Wilton Rogério Lustri.
2000 – 2004	Bacharelado em Comunicação Audiovisual: Imagem e Som Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS

CECCHETTO, J.; FERNANDES, F. C. B.; LOPES, R.; BUENO, P. R. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. **Biosens. Bioelectron.** v. 87, p. 949-956, 2017.

CRUZ, C. R.; LOPES, R.; FALCOSKI, T. O. R. S.; SILVA, J. C. P.; COSTA, P. I. CB. Desenvolvimento de infecção *in vitro* de células Huh-7.5 com o vírus da hepatite B. **Rev Ciên Farm Básica Apl.**, Araraquara, v. 38, Supl. 1, Agosto 2017.

MURBACH, H. D.; OGAWA, G. J.; BORGES, F. A.; MIRANDA, M. C. R.; LOPES, R.; BARROS, N. R.; MAZALLI, A. V. G.; SILVA, R. G.; CINMAN, J. L. F.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **Int J Biomater.**, v. 2014, article ID 157952, 7 pages, 2014.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Participação no “3º Simpósio de Biotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto”, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 18 de agosto.

Participação no “Encontro Tecnocientífico de Citros”, realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, no dia 26 de junho de 2018.

Participação no evento “MINI WORKSHOP - Biossíntese de Produtos Naturais (QOSBio)”, no Instituto de Química de São Carlos, USP, em 18 de maio de 2018.

Apresentação de painel no “World Hepatitis Summit 2017”, de 1 a 3 de novembro de 2017, São Paulo: LOPES, R.; CRUZ, C. R.; FALCOSKI, T. O. R. S.; SILVA, J. C. P.; COSTA, P. I. **Development of a cellular platform supporting Hepatitis B virus infection and replication for research, drug design and diagnosis.**

Apresentação de painel no “5th International Symposium on Sensor Science (I3S 2017)”, de 27 a 29 de setembro de 2017, Barcelona: CECCHETTO, J.; FERNANDES, F. C. B.; LOPES, R.; BUENO, P. R. **The capacitive sensing of NS1 dengue biomarker for diagnosis.**

Apresentação de painel na “III Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / VII Congresso Farmacêutico da UNESP”, de 21 a 25 de agosto de 2017, Araraquara: CRUZ, C. R.; LOPES, R.; FALCOSKI, T. O. R. S.; SILVA, J. C. P.; COSTA, P. I. **Desenvolvimento de infecção *in vitro* de células Huh-7.5 com o vírus da hepatite B.**

Participação na “II Feira Internacional na UNESP e Road Show”, na UNESP São Paulo, dia 04 de abril de 2017.

Apresentação de painel no “XVII Curso Avançado de Patogênese do HIV”, de 29 de março a 5 de abril de 2017, São Paulo: SILVA, J. C. P.; SILVA, J. C.; LOPES, R.; MUNHOZ, A. P.; FIGUEIREDO, W. M.; COSTA, P. I. **Study of cytokine profiles secreted *ex vivo* by PBMC of HIV-MTB co-infected subjects.**

Participação na “1ª Escola de Modelagem Molecular da UNESP Araraquara”, 9 a 13 de janeiro de 2017, Araraquara.

COORIENTAÇÃO

Coorientação em projeto de Iniciação Científica intitulado “Desenvolvimento de infecção *in vitro* de células Huh-7.5 com o vírus da hepatite B”, aluna Carla Rios da Cruz, graduação em Farmácia - Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP, de agosto 2017 a agosto 2018.

OUTROS

Colaboração no desenvolvimento dos trabalhos de pós-graduação (doutorado) da aluna Isabela Haddad Peron intitulado “Estudo *in vitro* da influência dos compostos licopeno, hesperidina e tangeritina sobre a via lipídica associada à replicação e formação da lipopartícula do vírus da hepatite C” e da aluna Moema de Souza Santana intitulado “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”.

Colaboração no desenvolvimento do trabalho de Iniciação Científica da aluna Caroline Moino, da graduação em Farmácia-Bioquímica FCFAr-Araraquara-UNESP intitulado “Desenvolvimento do teste de citometria de fluxo com o substrato celular Huh 7.5/SGR-JFH1 como método confirmatório sorológico da infecção pelo vírus da hepatite C”.

Participação no projeto aprovado de pesquisa regular da FAPESP, nº 2017/04500-9.

Participação no projeto aprovado de auxílio a projeto individual de pesquisa, do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (PADC), da FCFAr – UNESP, nº 250 - 10/2017.

Apresentação de Seminário Geral, 08 de junho de 2017. **Antioxidantes e o ciclo de replicação do vírus da hepatite C.**

Estágio de docência – 1º semestre de 2016. 45h – Disciplina da graduação: Imunologia Clínica - Instituição: FCFAr, UNESP, Araraquara. Supervisor do estágio de docência: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa.

Estágio de docência – 2º semestre de 2015. 45h – Disciplina da graduação: Biotecnologia - Instituição: FCFAr, UNESP, Araraquara. Supervisora do estágio de docência: Prof.^a Dr.^a Rosemeire Cristina L. R. Pietro.

Agradecimentos

A Deus. ‘Um dia vamos todos morrer, mas todos os outros nós viveremos’.

Aos meus pais, dona Nora e seu Neno (sua memória sempre viva em meu coração), e meus irmãos Dê, Rê e Jú. *You are the sunshine of my life.*

Ao meu marido, Alexandre. Você fez meus fins de semana no laboratório mais leves, dormindo na cadeira, esperando por mim. Isso não tem preço.

Aos grandes amigos, antigos e novos, em especial Ju Cecchetto, Carla, Moema, Rafael, Isabela, Mariana pelas dicas valiosas de western blot, pessoal do aprimoramento que vem e vai e sempre faz falta, e aos funcionários da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia do Núcleo de Atendimento à Comunidade-FCF-UNESP.

Aos meus orientadores, Prof.^a Dr.^a Ana Maria Minarelli Gaspar e Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa. Vocês foram minha luz no fim do túnel, e eu serei eternamente grata! Não tenho como agradecer a todo o apoio, a força, a amizade e o companheirismo que vocês me agradeceram, portanto, deixo registrado o meu “muito obrigada!”.

À “Apath L.L.C.”, detentora das linhagens celulares Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o *replicon* subgenômico SGR-JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis-1*, genótipo 2a), que autorizou o uso das células, e à Prof.^a Dr.^a 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), que as cedeu gentilmente ao coorientador desta pesquisa Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, da FCFAr-UNESP/Araraquara.

À Prof.^a Dr.^a Thaís Borges César, do Departamento de Alimentos e Nutrição, por ceder os compostos naringenina e nobiletina.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti do Departamento de Análises Clínicas da FCFAr-UNESP/Araraquara, por ceder os compostos curcumina e piperina.

À Prof.^a Dr.^a Amanda Martins Baviera, do Departamento de Análises Clínicas da FCFAr-UNESP/Araraquara.

À Prof.^a Dr.^a Débora Simões de Almeida Colombari, do laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia, UNESP/Araraquara, por gentilmente permitir o uso do laboratório e do espectrofluorímetro Synergy (Biotek). Também às suas alunas, Jéssica e Raphaela, pelo apoio, atenção e cooperação. Foi um prazer conhecê-las!

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, do Instituto de Química, UNESP/Araraquara, meu ex-orientador nos primeiros dois anos de doutorado em projeto distinto, pela experiência vivida e por permitir o uso da leitora de microplacas Accuskan GO (Thermofisher) no presente trabalho, até que a nossa chegasse. Aos meus colegas daquele laboratório, pela companhia.

Ao funcionário Júlio César de Paula e Silva, da Fundação para o Desenvolvimento das Ciências Farmacêuticas, pela realização das etapas de extração, purificação e amplificação na quantificação automatizada de RNA viral, no sistema da Abbott Laboratórios do Brasil.

À funcionária Ana Paula Munhoz, da Fundação para o Desenvolvimento das Ciências Farmacêuticas, pela captura dos dados de citometria de fluxo, no citômetro BD FACSCalibur (BD Biosciences).

À CAPES pela concessão da bolsa. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio regular à pesquisa, n° 2017/04500-9.

Ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (PADC), da FCFAr – UNESP, n° 250 - 10/2017, pelo auxílio a projeto individual de pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho cujos nomes não foram citados, mas que sabem da sua importância.

Muito obrigada a todos!

Rute

Don't fear challenge
don't fear hardship
as long as you persist.

RESUMO

LOPES, R. **Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células expressando o SGR-JFH1** (Tese). Araraquara: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2019. 112 p.

A hepatite C é uma doença inflamatória crônica, causada pelo vírus da hepatite C (HCV), que constitui um grave problema de saúde pública, pois acomete milhares de pessoas no mundo todo, podendo evoluir para cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular. Os tratamentos atualmente disponíveis podem não ser eficientes para todos os genótipos ou situação clínica associada ao grau de fibrose hepática, e podem induzir importantes efeitos colaterais. Neste contexto, a análise de compostos naturais bioativos (CNBs) representa uma via importante para complementar os tratamentos já estabelecidos, potencializando os resultados terapêuticos. O objetivo deste estudo foi caracterizar as etapas finais da biossíntese do HCV, concomitante ao metabolismo lipídico celular associado à formação e secreção das lipopartículas virais, e, analisar os mecanismos moleculares em culturas celulares, quando submetidas a diferentes tratamentos com os CNBs: curcumina, piperina, naringenina e nobiletina. Estes CNBs foram avaliados quanto a diversos efeitos sobre células infectadas ou não com o HCV, por meio de ensaios de viabilidade celular, atividade enzimática por fluorescência, apoptose pela avaliação da ligação de anexina V por citometria de fluxo e determinação de níveis de expressão de proteínas por *western blotting*. Os resultados demonstraram efeito de inibição da replicação ou liberação da partícula viral em diferentes condições de tratamento, indução de apoptose nas células infectadas com o HCV, discreta inibição da atividade de MTTP (principalmente nas células não-infectadas), e diferentes padrões de inibição ou estimulação da expressão de proteínas, indicando que os tratamentos podem atuar sobre vias diferentes de sinalização celular. A análise do desempenho dos CNBs, considerando a inibição da carga viral, a indução da apoptose e a inibição da enzima MTTP, indicou que a combinação CL/PP teve melhor performance dentre os compostos testados. Desta forma, os CNBs estudados apresentaram efeitos potencialmente vantajosos para utilização como terapia complementar ao tratamento alopático da hepatite C.

Palavras-chave: Hepatite C; células hepáticas; compostos bioativos; produtos naturais; flavonoides.

ABSTRACT

LOPES, R. **Study of natural bioactive compounds effect on lipid metabolism of Huh-7.5 cells and the interaction with hepatitis C virus replication cycle in cells expressing the SGR-JFH1** (Thesis). Araraquara: Institute of Chemistry, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, 2019. p. 112.

Hepatitis C is a chronic inflammatory disease caused by hepatitis C virus (HCV). It constitutes a serious public health issue, affecting millions of people worldwide, and it can progress to liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. The available treatment regimen might not be efficient to all genotypes or clinical status associated to the degree of hepatic fibrosis, and it can induce the development of important collateral effects. In this context, the analysis of natural bioactive compounds (NBCs) represents an important pathway to supplement the already established treatments, enhancing the therapeutic outcome. The aim of this study was to characterize the final stages of HCV biosynthesis, concomitant with the cellular lipid metabolism, associated with the formation and secretion of viral lipoviral particles, and analyze molecular mechanisms in cell cultures, when submitted to different treatments with the NBCs: curcumin, piperine, naringenin, and nobiletin. These NBCs were evaluated based on distinct effects on infected with HCV or non-infected cells, through viability assays, fluorescence enzymatic activity, apoptosis analysis through the evaluation of annexin V binding by flow cytometry, and protein expression level detection by western blotting. The results demonstrate inhibition of replication or release of the viral particle under different treatment conditions, induction of apoptosis on HCV infected cells, discrete inhibition of MTTP activity (mainly on non-infected cells), and different patterns of inhibition or stimulation of protein expression, indicating that the treatments act over different cell signaling pathways. Considering the results of viral load inhibition, apoptosis induction and MTTP enzyme inhibition, the NBCs performance analysis indicated that the combination CL/PP achieved the best results amongst the tested compounds. Therefore, the studied NBCs presented effects potentially advantageous to be applied as complementary therapy to the allopathic treatment of hepatitis C infection.

Keywords: Hepatitis C; hepatic cells; bioactive compounds; natural products; flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Via de sinalização intracelular relacionada ao metabolismo lipídico.</i>	26
<i>Figura 2. Modelo da estrutura da partícula do HCV.</i>	30
<i>Figura 3. Ciclo de replicação do vírus da hepatite C.</i>	32
<i>Figura 4. Classificação dos fitoquímicos.</i>	34
<i>Figura 5. Delineamento experimental.</i>	43
<i>Figura 6. Análise de proliferação celular pelo método de coloração com cristal violeta para as linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.</i>	60
<i>Figura 7. Viabilidade celular das células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com H₂O₂.</i>	64
<i>Figura 8. Análise quantitativa por qRT-PCR da carga viral de RNA do HCV em sobrenadante de células SGR-JFH1.</i>	64
<i>Figura 9. Curva padrão de albumina bovina utilizada para o cálculo da concentração de das proteínas totais no lisado celular.</i>	65
<i>Figura 10. Curva padrão do ensaio de atividade de MTTP.</i>	66
<i>Figura 11. Índice de carga viral de RNA do HCV em meio intracelular e sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com CL, PP e CL/PP.</i>	67
<i>Figura 12. Índice de atividade de MTTP por fluorescência em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 tratadas com CL, PP e CL/PP.</i>	70
<i>Figura 13. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.</i>	72
<i>Figura 14. Análise do índice de apoptose em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com CL, PP e CL/PP.</i>	73
<i>Figura 15. Esquema do método empregado em western blotting.</i>	75
<i>Figura 16. Expressão proteica em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com CL, PP e CL/PP, em membranas de PVDF, por western blotting.</i>	75
<i>Figura 17. Índice de expressão de proteínas em razão de células SGR-JFH1 por Huh-7.5.</i>	76
<i>Figura 18. Esquema das vias de sinalização e metabolismo celular após tratamento com os CNBs.</i>	80
<i>Figura 19. Índice de carga viral de RNA do HCV em meio intracelular e sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com NG.</i>	82
<i>Figura 20. Índice da atividade de MTTP em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 tratadas NG.</i>	83
<i>Figura 21. Índice de apoptose por citometria de fluxo em células tratadas com NG.</i>	84
<i>Figura 22. Painel de proteínas avaliadas por western blotting após tratamento de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 com NG.</i>	85
<i>Figura 23. Análise de proteínas avaliadas por western blotting após tratamento com NG.</i>	86
<i>Figura 24. Esquema das vias de sinalização e metabolismo celular após tratamento com NG.</i>	86
<i>Figura 25. Índice de carga viral do HCV em células SGR-JFH1 após tratamento com NOB.</i>	89
<i>Figura 26. Análise da atividade de MTTP em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 tratadas com NOB.</i>	90
<i>Figura 27. Análise de níveis de apoptose em células tratadas com NOB.</i>	91

<i>Figura 28. Paineis de proteínas avaliadas por western blotting após tratamento de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 com NOB.</i>	92
<i>Figura 29. Análise de proteínas avaliadas por western blotting após tratamento com NOB.</i>	92
<i>Figura 30. Esquema das vias de sinalização e metabolismo célula após tratamento com NOB.</i>	93

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos para as linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.</i>	61
<i>Tabela 2. Pontuação de desempenho geral dos CNBs.</i>	95
<i>Tabela 3. Análise qualitativa dos CNBs quanto à determinação dos níveis de expressão protéicas.</i>	96

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil-CoA:colesterol aciltransferase
ACC	acetil-CoA carboxilase
ADP	Adenosina difosfato
AGEs	<i>Advanced glycation endproducts</i> – produtos finais de glicação avançada
Akt	Serina-treonina quinase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	<i>5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> – proteína quinase ativada por 5'-adenosina monofosfato
Apo(A, B, C, E)	Apolipoproteínas A, B, C, ou E
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine albumin serum</i> – albumina de soro bovino
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i> – proteína estimuladora ligante de CCAAT
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i> – Proteína de transferência do éster de colesterol
CL	Curcumina
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i> – proteína de ligação ao AMP cíclico
DAA	<i>Direct-acting antiviral</i> – antiviral de ação direta
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco.
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massa com ionização <i>electrospray</i>
FDPS	<i>Farnesyl pyrophosphate synthetase</i> – farnesil pirofosfato sintetase
FXR	<i>Nuclear farnesoid X receptor</i> – receptor nuclear de farnesoide X
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i> – glicogênio sintase quinase 3 β
HDL	<i>High density lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA(R)	3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (redutase)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
HSV-1	Vírus da herpes simplex tipo 1
IDL	<i>Intermediate-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de densidade intermediária
INPP4B	<i>Inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B</i> – Fosfatase inositol polifosfato-4 tipo II B
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> – quinase c-Jun N-terminal
LD	<i>Lipid droplet</i> – gotícula lipídica
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	Receptor de LDL
LKB1	<i>Liver kinase B1</i> – quinase hepática B1

MM	Massa molecular
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> – alvo mamífero da rapamicina
MTP/MTTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i> – Proteína microssomal transferidora de triglicerídes
NG	Naringenina
NOB	Nobiletina
PEGIFN- α	Interferon peguilado alfa
PHLPP	<i>PH domain leucine-reach repeat protein phosphatase</i> – Fosfatase proteica de domínio PH rico em repetição de leucina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase B, também chamada Akt
PMFs	Polimetoxiflavonas
PP	Piperina
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> – receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> – Homólogo de fosfatase e tensina
RdRp	RNA-polimerase RNA-dependente
RE(L/R)	Retículo endoplasmático (liso/rugoso)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SIRT1	sirtuína 1
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i> – proteína de ligação ao elemento regulador de estero
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i> – Unc-51 símile quinase ativadora de autofagia
UTR	<i>Untranslated region</i> – região não traduzida
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

I.	Introdução	19
II.	Revisão Bibliográfica	22
2.1.	O metabolismo lipídico	22
2.2.	Hepatite C	28
2.2.1.	A partícula viral	29
2.2.2.	O ciclo de replicação do HCV	31
2.3.	Compostos naturais bioativos	33
2.3.1.	Curcumina	35
2.3.2.	Piperina	36
2.3.3.	Naringenina	37
2.3.4.	Nobiletina	38
III.	Objetivos	41
IV.	Material e Métodos	43
4.1.	Delineamento experimental	43
4.2.	Compostos Naturais Bioativos	44
4.3.	Cultura celular	44
4.4.	Proliferação celular pelo ensaio de cristal violeta	45
4.5.	Viabilidade celular pelo ensaio de MTT	46
4.6.	Quantificação de RNA viral	47
4.6.1.	Células sem tratamento	49
4.6.1.	Células pós-tratamento com CNBs	49
4.7.	Quantificação de proteínas totais	50
4.8.	Atividade de MTTP por fluorescência	51
4.9.	Análise de apoptose por citometria de fluxo	52
4.10.	Determinação de proteínas associadas à sinalização celular por <i>western blotting</i>	53
4.11.	Análise estatística	55
V.	Resultados e Discussão	60
5.1.	Proliferação celular pelo ensaio de cristal violeta	60
5.2.	Viabilidade celular pelo ensaio de MTT	61
5.3.	Quantificação de RNA viral	64
5.4.	Quantificação de proteínas totais	65
5.5.	Atividade de MTTP	65
	Grupo 1. Curcumina, Piperina e Curcumina concomitante à Piperina	66

5.6.	Quantificação de RNA viral	66
5.7.	Atividade de MTTP.....	69
5.8.	Análise de apoptose.....	71
5.9.	Determinação de níveis de expressão de proteínas por <i>western blotting</i>	74
	Grupo 2. Naringenina	81
5.10.	Quantificação de RNA viral	81
5.11.	Atividade de MTTP.....	83
5.12.	Análise de apoptose.....	84
5.13.	Determinação de níveis de expressão de proteínas por <i>western blotting</i>	85
	Grupo 3. Nobiletina.....	88
5.14.	Quantificação de RNA viral	88
5.15.	Atividade de MTTP	89
5.16.	Análise de apoptose.....	90
5.17.	Determinação de níveis de expressão de proteínas por <i>western blotting</i>	91
	Análise de desempenho	94
VI.	Conclusões	98
	Referências.....	100
	Apêndice.....	116

I. Introdução



I. INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença inflamatória crônica que está classificada entre as principais hepatites virais devido à distribuição mundial e aos prejuízos significativos causados à saúde pública.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2015 a hepatite C crônica acometeu 71 milhões de pessoas. Neste mesmo ano, a prevalência global da doença foi de 1% da população, sendo que o número de recém-infectados (1,75 milhão) excedeu o de mortes (399 mil) diretamente relacionadas a complicações hepáticas decorrentes da doença crônica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). 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 dispõe de bancos de sangue e hemocentros como principal fonte notificadora em áreas geográficas restritas e é, portanto, grupo-específico, o que dificulta a estimativa para a população geral (CARVALHO *et al.*, 2014; CRUZ; SHIRASSU; MARTINS, 2009; MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2010). Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, de 1999 a 2016 foram registrados 155 mil casos em que ambos os marcadores anti-HCV e RNA-HCV foram detectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O objetivo geral do tratamento da doença é manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente através de uma terapia segura, que promova a redução da progressão do dano hepático e previna as complicações decorrentes da cirrose, de forma a prevenir a evolução ao carcinoma hepatocelular (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2014).

Novos agentes antivirais de ação direta (DAAs) foram desenvolvidos e estão sendo pesquisados; inicialmente alguns foram utilizados concomitantemente com PEGIFN- α e ribavirina, o que levou ao aumento simultâneo das taxas de resposta e dos efeitos tóxicos. Contudo a combinação dos DAAs em diferentes estágios do ciclo viral se mostra altamente efetiva e possibilita o desenvolvimento de tratamentos sem interferon ou sem ribavirina, o que aumenta a tolerabilidade (FELD *et al.*, 2015; GÖTTE; FELD, 2016; KUMTHIP; MANEEKARN, 2015).

No Brasil, o Ministério da Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) preconiza a terapêutica baseada em PEGIFN- α -2a, PEGIFN- α -2b, ribavirina, e os DAAs sofosbuvir, daclatasvir e simeprevir, em diferentes combinações e posologias,

de acordo com genótipo do vírus, presença de coinfecção, de fibrose hepática avançada, entre outros fatores (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Para melhorar a taxa de êxito no tratamento, outras monoterapias ou combinações terapêuticas têm sido investigadas (NOORALI; PACE; BAGASRA, 2011).

Os compostos naturais bioativos (CNBs) podem prover uma via complementar às terapias existentes. Muitos destes compostos têm demonstrado diversas características benéficas na terapêutica de várias doenças, e apresentam ampla diversidade química, baixo custo de produção e efeitos colaterais mais brandos ou inexistentes (JARDIM *et al.*, 2015).

Desta forma, o estudo da relação entre a atividade de CNBs com o vírus da hepatite C (HCV), em suas diversas etapas extra e intracelulares se justifica como uma necessidade para melhor compreensão dos mecanismos e vias moleculares influenciadas pelo ciclo replicativo e formação de novas lipopartículas virais, e, consequentemente, para o aprimoramento dos tratamentos disponíveis.

VI. Conclusões



VI. CONCLUSÕES

Este estudo examinou os mecanismos pelos quais os CNBs curcumina, piperina, a combinação de curcumina e piperina, naringenina e nobiletina atuam na infecção pelo HCV, quanto a diferentes efeitos biológicos.

Quanto ao efeito sobre a replicação do RNA viral do HCV, foram avaliados períodos diferentes de incubação dos CNBs nas células infectadas com o vírus. Em todos os tratamentos, o período mais longo resultou em redução mais pronunciada, com grande potencial para utilização em terapia complementar da doença. Além disso, de forma geral, o impacto sobre a liberação do vírus no meio extracelular foi maior que o observado dentro da célula. A identificação das etapas em que cada CNB atua poderia ser útil para a determinação da melhor combinação terapêutica.

Em relação à ação dos tratamentos sobre a atividade da enzima MTTP, que apresenta um papel importante no metabolismo lipídico e no ciclo de replicação do HCV, os CNBs exibiram inibição enzimática discreta, quase que restrita às células não-infectadas, o que leva a crer que esta não seja uma via sobre a qual os CNBs influenciam na interação vírus-célula hospedeira.

No que concerne os níveis de indução de apoptose, há uma tendência de aumento após tratamento nas células infectadas, sugerindo efeito pró-apoptótico dos CNBs.

Por fim, os resultados relativos à expressão proteica foram preliminares, e limitados à análise da influência dos tratamentos no comportamento viral, pela relação das células SGR-JFH1 e as células Huh-7.5. Nesta etapa, foram observados efeitos sobre as vias de proliferação, apoptose, metabolismo celular e lipídico, e os tratamentos apresentaram respostas diferentes, demonstrando capacidade distinta de interação nas vias metabólicas e de sinalização celular.

Desta forma, diante dos resultados obtidos, é possível concluir que CNBs apresentam potencial terapêutico complementar no tratamento de hepatite C, o que deve ser avaliado de acordo com a aplicação específica desejada, seja no ciclo de replicação viral, ou nas consequências da persistência e cronicidade da doença, com a possibilidade de melhoramento dos esquemas terapêuticos atuais.

Referências

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; DEB, L.; PRASAD, S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 185–205, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/1/185>. Acesso em: 5 fev. 2019.

AIZAWA, Y. *et al.* Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World J. Gastroenterol.*, v. 21, n. 36, p. 10299–10313, 2015. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i36/10299.htm>. Acesso em: 10 mar. 2019.

ALAM, M. A. *et al.* Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv. Nutr.*, v. 5, n. 4, p. 404–417, 2014.

ALLISTER, E. M. *et al.* Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein expression and apolipoprotein B100 secretion by the citrus flavonoid naringenin and by insulin involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in hepatocytes. *Diabetes*, v. 54, n. 6, p. 1676–1683, 2005.

AMANO, R. *et al.* Cinnamic acid derivatives inhibit hepatitis C virus replication via the induction of oxidative stress. *Antiviral Res.*, v. 145, p. 123–130, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.018>. Acesso em: 3 fev. 2019.

ANGGAKUSUMA *et al.* Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut*, v. 63, n. 7, p. 1137–1149, 2014.

ARCARO, C. A. *et al.* Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One*, v. 9, n. 12, p. e113993, 2014. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0113993>. Acesso em: 6 fev. 2019.

ASSINI, J. M. *et al.* Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr^{-/-}* mice. *J. Lipid Res.*, v. 54, n. 3, p. 711–24, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269394> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3617945>. Acesso em: 5 fev. 2019.

ASSIS, R. P. *et al.* 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.*, v. 18, n. 332, 2017.

ATAL, S. *et al.* Bio-enhancing effect of piperine with metformin on lowering blood glucose level in alloxan induced diabetic mice. *Pharmacogn. Res.*, v. 8, n. 1, p. 56, 2016. Disponível em: <http://www.phcogres.com/text.asp?2016/8/1/56/171096>. Acesso em: 6 fev. 2019.

BARTENSCHLAGER, R.; COSSET, F.-L.; LOHMANN, V. Hepatitis C virus replication cycle. *J. Hepatol.*, v. 53, n. 3, p. 583–585, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.015><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827810004745>. Acesso em: 28 out. 2018.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 11, n. 7, p. 482–496, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3046>. Acesso em: 28 out. 2018.

BIESALSKI, H. K. *et al.* Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções*. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfeccoes>. Acesso em: 16 ago. 2019.

BURLONE, M. E.; BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.*, v. 90, n. 5, p. 1055–1070, 2009. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.008300-0>. Acesso em: 28 out. 2018.

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. *Sci. Rep.*, v. 6, n. October 2015, p. 21510, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/srep/2016/160222/srep21510/full/srep21510.html>. Acesso em: 28 out. 2018.

CALLAND, N. *et al.* Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? *Viruses*, v. 4, n. 10, p. 2197–2217, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497048/>. Acesso em: 28 out. 2018.

CARVALHO, J. *et al.* Método para estimação de prevalência de hepatites B e C crônicas e cirrose hepática - Brasil, 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 23, n. 4, p. 691–700, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Hepatitis C FAQs for health professionals*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#section1>. Acesso em: 6 jan. 2017.

CHAMPEIMONT, R. *et al.* Coevolution analysis of hepatitis C virus genome to identify the structural and functional dependency network of viral proteins. *Sci. Rep.*, v. 6, n. May, p. 26401, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/srep/2016/160520/srep26401/full/srep26401.html>. Acesso em: 8 out. 2018.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp. Physiol.*, v. 93, n. 1, p. 27–42, 2008.

CHEN, L.-C. *et al.* Development and characterization of lecithin-based self-assembling mixed polymeric micellar (saMPMs) drug delivery systems for curcumin. *Sci. Rep.*, v. 6, n. August, p. 37122, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep37122>. Acesso em: 5 fev. 2019.

CHEN, M. H. *et al.* Curcumin inhibits HCV replication by induction of heme oxygenase-1 and suppression of AKT. *Int. J. Mol. Med.*, v. 30, n. 5, p. 1021–1028, 2012.

CHOO, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.

CHU, C. C. *et al.* Antiproliferative effect of sweet orange peel and its bioactive compounds against human hepatoma cells, in vitro and in vivo. *J. Funct. Foods*, v. 33, p. 363–375, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.051>. Acesso em: 27 jul. 2019.

CIRILLO, P. *et al.* Nobiletin inhibits oxidized-LDL mediated expression of tissue factor in human endothelial cells through inhibition of NF- κ B. *Biochem. Pharmacol. (Amsterdam, Neth.)*, v. 128, p. 26–33, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.016>. Acesso em: 29 out. 2018.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416513000512>. Acesso em: 19 fev. 2019.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; BOUGHABA, J. A.; *et al.* Dead cert: measuring cell death. *Cold Spring Harb. Protoc.*, n. 12, p. 1064–1072, 2016. Disponível em: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.top070318>. Acesso em: 2 dez. 2016.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.*, n. 11, p. 1–6, 2016. Disponível em: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot087288>. Acesso em: 4 nov. 2016.

CRUZ-GARCIA, L.; SCHLEGEL, A. Lxr-driven enterocyte lipid droplet formation delays transport of ingested lipids. *J. Lipid Res.*, v. 55, n. 9, p. 1944–1958, 2014. Disponível em: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M052845>. Acesso em: 6 jan. 2017.

CRUZ, C. R. B.; SHIRASSU, M. M.; MARTINS, W. P. Comparação do perfil epidemiológico das hepatites B e C em um serviço público de São Paulo. *Arq. Gastroenterol.*, v. 46, n. 3, p. 225–229, 2009.

DE NICOLA, S. *et al.* Interaction between PNPLA3 I148M variant and age at infection in determining fibrosis progression in chronic hepatitis C. *PLoS One*, v. 9, n. 8, 2014.

DEBOSE-BOYD, R. A.; YE, J. SREBPs in lipid metabolism, insulin signaling, and beyond. *Trends Biochem. Sci.*, v. 43, n. 5, p. 358–368, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.005>. Acesso em: 28 out. 2018.

DIFFENDERFER, M. R. *et al.* Distinct metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein(a). *Metabolism*, v. 65, n. 4, p. 381–390, 2016.

DOLKA, I.; KRÓL, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study. *Res. Vet. Sci.*, v. 105, p. 124–133, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.004>. Acesso em: 4 abr. 2019.

DUBUISSON, J.; COSSET, F.-L. F. L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – an update. *J. Hepatol.*, v. 61, n. 1, p. S3–S13, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814004619>. Acesso em: 28 out. 2018.

DUSABIMANA, T. *et al.* Nobiletin ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury through the activation of SIRT-1/FOXO3a-mediated autophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Mol. Med.*, v. 51, n. 4, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-019-0245-z>. Acesso em: 24 ago. 2019.

ECHEVERRÍA, N. *et al.* Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J. Hepatol.*, v. 7, n. 6, p. 831–845, 2015. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i6/831.htm>. Acesso em: 28 out. 2018.

ELLIS, K. L. *et al.* Progress in the care of common inherited atherogenic disorders of apolipoprotein B metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v. 12, n. 8, p. 467–484, 2016. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84969640874&partnerID=40&md5=73c8d0ca65bb09d6cc1800b8dac2c121>. Acesso em: 28 out. 2018.

FELD, J. J. *et al.* Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N. Engl. J. Med.*, v. 373, n. 27, p. 2599–2607, 2015.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.*, n. 4, p. 343–346, 2016.

GEROLD, G.; RICE, C. M. Locking out hepatitis C. *Nat. Med.* (N. Y., NY, U. S.), v. 17, n. 5, p. 542–544, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546968>. Acesso em: 28 out. 2018.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: a recent update. *Food Chem. Toxicol.*, v. 83, p. 111–124, 2015.

GOLDWASSER, J. *et al.* Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J. Hepatol.*, v. 55, n. 5, p. 963–971, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.011>. Acesso em: 28 out. 2018.

GONÇALVES, D. R. *et al.* Analysis of fluorescence spectra of citrus polymethoxylated flavones and their incorporation into mammalian cells. *J. Agric. Food Chem.*, v. 66, n. 28, p. 7531–7541, 2018. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b02052>. Acesso em: 19 dez. 2018.

GONÇALVES, D. R. *Isolamento e identificação de metabólitos de polimetoxiflavonas na urina de ratos e sua avaliação sobre a proteína transferidora de triglicérideo microsomal*. Araraquara: Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” 2016. 116 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.

GONZALEZ, F. A. *et al.* Liver stiffness and aspartate aminotransferase levels predict the risk for liver fibrosis progression in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. *HIV Med.*, v. 16, n. 4, p. 211–218, 2015.

GÖTTE, M.; FELD, J. J. Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 13, n. 6, p. 338–351, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.60>. Acesso em: 28 out. 2018.

HAN, S. ZHAI *et al.* Piperine (PP) enhanced mitomycin-C (MMC) therapy of human cervical cancer through suppressing bcl-2 signaling pathway via inactivating STAT3/NF- κ B. *Biomed. Pharmacother.*, v. 96, p. 1403–1410, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.022>. Acesso em: 12 fev. 2019.

HENRIKSSON, E. V. A. *et al.* Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Anim.*, v. 42, n. 10, p. 320–323, 2006. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/20460120>. Acesso em: 6 jul. 2017.

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 19, n. 2, p. 121–135, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.95>. Acesso em: 28 out. 2018.

HIRATA, N. *et al.* Functional characterization of lysosomal interaction of Akt with VRK2. *Oncogene*, v. 37, p. 5367–5386, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0330-0>. Acesso em: 28 out. 2018.

HUANG, H. *et al.* The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro. *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/2918796/>. Acesso em: 18 dez. 2017.

HUSSAIN, M. M.; NIJSTAD, N.; FRANCESCHINI, L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. *Clin. Lipidol.*, v. 6, n. 3, p. 293–303, 2011. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/clp.11.21>. Acesso em: 28 dez. 2016.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.018>. Acesso em: 28 out. 2018.

JEE, M. H. *et al.* New mechanism of hepatic fibrogenesis: hepatitis C virus infection induces transforming growth factor β 1 production through glucose-regulated protein 94. *J. Virol.*, v. 90, n. 6, p. 3044–3055, 2016. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/90/6/3044.short>. Acesso em: 28 out. 2018.

JIA, B. *et al.* Naringenin improve hepatitis C virus infection induced insulin resistance by increase PTEN expression via p53-dependent manner. *Biomed. Pharmacother.*, v. 103, p. 746–754, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.110>. Acesso em: 27 jul. 2019.

JIANG, Y. P.; GUO, H.; WANG, X. B. Nobiletin (NOB) suppresses autophagic degradation via over-expressing AKT pathway and enhances apoptosis in multidrug-resistant SKOV3/TAX ovarian cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, v. 103, p. 29–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.126>. Acesso em: 29 out. 2018.

JIN, C. Y. *et al.* Naringenin-induced apoptosis is attenuated by bcl-2 but restored by the small molecule bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human leukemia U937 cells. *Toxicol. In Vitro*, v. 23, n. 2, p. 259–265, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.005>. Acesso em: 27 jul. 2019.

JONES, D. M.; MCLAUCHLAN, J. Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles. *J. Biol. Chem.*, v. 285, n. 30, p. 22733–22739, 2010.

JÓZWIAK, P. *et al.* O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. *Front. Endocrinol.*, v. 5, n. SEP, p. 1–13, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2014.00145/abstract>. Acesso em: 28 out. 2018.

KANNO, S. *et al.* Naringenin-induced apoptosis via activation of NF- κ B and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol. Lett.*, v. 166, n. 2, p. 131–139, 2006.

KIM, K. *et al.* Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Lett.*, v. 584, n. 4, p. 707–712, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.019>. Acesso em: 5 fev. 2019.

KONDURU, A. S.; 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.*, v. 6, n. 31695, p. 1–15, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27538525>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4990917>. Acesso em: 5 fev. 2019.

KUMAR, D. *et al.* Curcumin and ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.*, v. 81, p. 31–37, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.037>. Acesso em: 11 fev. 2019.

KUMTHIP, K.; MANEEKARN, N. The role of HCV proteins on treatment outcomes. *Viol. J.*, v. 12, n. 217, p. 1–12, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4678629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 28 out. 2018.

LAI, L. *et al.* Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 33, n. 4, p. 523–530, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2011.209>. Acesso em: 5 fev. 2019.

LEE, Y. S. *et al.* Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *J. Nutr. Biochem.*, v. 24, n. 1, p. 156–162, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.014>. Acesso em: 28 out. 2018.

LI, X. *et al.* Isocaloric pair-fed high-carbohydrate diet induced more hepatic steatosis and inflammation than high-fat diet mediated by miR-34a/SIRT1 axis in mice. *Sci. Rep.*, v. 5, n. 16774, p. 1–12, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep16774>. Acesso em: 28 out. 2018.

LIN, S. C. *et al.* Antiviral activity of nobiletin against chikungunya virus in vitro. *Antiviral Ther.*, v. 22, n. 8, p. 689–697, 2017.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 11, n. 10, p. 688–700, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3098>
<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n10/pdf/nrmicro3098.pdf>. Acesso em: 28 out. 2018.

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. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 30939, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep30939>. Acesso em: 28 out. 2018.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. *J. Food Sci.*, v. 78, n. S1, p. A18–A25, 2013.

LIU, ZHE *et al.* Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *J. Biol. Chem.*, v. 287, n. 50, p. 41922–41930, 2012. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.414789>. Acesso em: 14 mar. 2018.

LIU, ZHEN *et al.* Curcumin activates AMPK pathway and regulates lipid metabolism in rats following prolonged clozapine exposure. *Front. Neurosci.*, v. 11, n. 558, p. 1–8, 2017.

LONE, J.; PARRAY, H. A.; YUN, J. W. Nobiletin induces brown adipocyte-like phenotype and ameliorates stress in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie*, v. 146, p. 97–104, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.021>. Acesso em: 29 out. 2018.

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.

LYU, S. Y.; RHIM, J. Y.; PARK, W. B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch. Pharmacol Res.*, v. 28, n. 11, p. 1293–1301, 2005.

MA, W. *et al.* Nobiletin enhances the efficacy of chemotherapeutic agents in ABCB1 overexpression cancer cells. *Sci. Rep.*, v. 5, n. 18789, p. 1–15, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18789>. Acesso em: 29 out. 2018.

MANKOURI, J. *et al.* Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 107, n. 25, p. 11549–11554, 2010.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>. Acesso em: 28 out. 2018.

MANNS, M. P. *et al.* Hepatitis C virus infection. *Primer*, v. 3, n. 17006, p. 1–19, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>. Acesso em: 28 out. 2018.

MARÔCO, J. *Análise estatística com o SPSS Statistics*. 6. ed. Pêro Pinheiro, Portugal: Report Number, 2014.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. DE L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2010. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&%5Cnpid=S0104-42302011000100024. Acesso em: 6 jan. 2017.

MASALOVA, O. V. *et al.* Modulation of cell death pathways by hepatitis C virus proteins in Huh7.5 hepatoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, n. 11, p. 1–16, 2017.

MCRAE, S. *et al.* The hepatitis C virus-induced NLRP3 inflammasome activates the sterol regulatory element-binding protein (SREBP) and regulates lipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, v. 291, n. 7, p. 3254–3267, 2016.

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

MORALES, J. M.; FABRIZI, F. Hepatitis C and its impact on renal transplantation. *Nat Rev Nephrol*, v. 11, n. 3, p. 172–182, mar. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2015.5>.

MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, v. 3, p. 1–14, 2012.

MULVIHILL, E. E. *et al.* Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, v. 60, n. 5, p. 1446–1457, 2011.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *Can. J. Cardiol.*, v. 26, n. S-A, p. 17A-21A, 2010.

MUSSO, G.; CASSADER, M.; GAMBINO, R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat. Rev. Drug Discovery*, v. 15, n. 4, p. 249–274, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd.2015.3>. Acesso em: 5 fev. 2019.

NABAVI, S. F. *et al.* Curcumin and liver disease: from chemistry to medicine. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 13, n. 1, p. 62–77, 2014.

NAHMIAS, Y. *et al.* Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, v. 47, n. 5, p. 1437–1445, 2008.

NAVARRO-YEPES, J. *et al.* Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid. Redox Signaling*, v. 21, n. 1, p. 66–85, 2014. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2014.5837>. Acesso em: 28 out. 2018.

NEUFELDT, C. J. *et al.* Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>. Acesso em: 28 out. 2018.

NIREI, K. *et al.* Steatosis influences the clinical profiles and long-term outcomes of interferon-treated chronic hepatitis C and liver cirrhosis patients. *Int. J. Med. Sci.*, v. 14, n. 1, p. 45–52, 2017.

NOGUCHI, S. *et al.* Nobiletin: a citrus flavonoid displaying potent physiological activity. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, v. 72, n. 2, p. 124–127, 2016. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053229616000577>. Acesso em: 28 out. 2018.

NOORALI, S.; PACE, D. G.; BAGASRA, O. Of lives and livers: emerging responses to the hepatitis C virus. *J. Infect. Dev. Countries*, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2011.

OCHIAI, A. *et al.* Piperine induces hepatic low-density lipoprotein receptor expression through proteolytic activation of sterol regulatory element-binding proteins. *PLoS One*, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.

PAL, M. K. *et al.* Synergistic effect of piperine and paclitaxel on cell fate via cyt-c, bax/bcl-2-caspase-3 pathway in ovarian adenocarcinomas SKOV-3 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 791, p. 751–762, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.019>. Acesso em: 20 ago. 2019.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.*, v. 5, n. e47, p. 1–15, 2016. Disponível em: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S2048679016000410. Acesso em: 28 out. 2018.

PARHOFER, K. G. The treatment of disorders of lipid metabolism. *Dtsch Arztebl Int.*, v. 113, p. 261–268, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27151464> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4860871>. Acesso em: 28 out. 2018.

PARK, C. Y. *et al.* Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 284, n. 14, p. 9237–9246, 2009.

POKORSKA-ŚPIEWAK, M. *et al.* The influence of hepatitis B and C virus coinfection on liver histopathology in children. *Eur. J. Pediatr.*, v. 174, n. 3, p. 345–353, 2015.

POPESCU, C.-I. *et al.* Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology*, v. 3, n. 4, p. 892–921, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2079-7737/3/4/892/>. Acesso em: 28 out. 2018.

PRECIADO, M. V. *et al.* Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.*, v. 20, n. 43, p. 15992–16013, 2014.

QI, G. *et al.* Nobiletin protects against insulin resistance and disorders of lipid metabolism by reprogramming of circadian clock in hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, v. 1863, n. 6, p. 549–562, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.02.009>. Acesso em: 29 out. 2018.

RAMOS, A. A.; LIMA, C. F.; PEREIRA-WILSON, C. DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention: what do we know? *DNA Repair*, p. 237–270, 2011.

RANDINO, R. *et al.* Investigating the neuroprotective effects of turmeric extract: structural interactions of β -amyloid peptide with single curcuminoids. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 38846, p. 1–17, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep38846>. Acesso em: 5 fev. 2019.

RECHTMAN, M. M. *et al.* Curcumin inhibits hepatitis B virus via down-regulation of the metabolic coactivator PGC-1 α . *FEBS Lett.*, v. 584, n. 11, p. 2485–2490, 2010.

REDDY, B. U. *et al.* Small molecule inhibitors of HCV replication from pomegranate. *Sci. Rep.*, v. 4, n. 5411, p. 1–10, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4067622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 5 fev. 2019.

REMMERIE, A.; SCOTT, C. L. Macrophages and lipid metabolism. *Cell. Immunol.*, v. 330, p. 27–42, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.020>. Acesso em: 28 out. 2018.

RIEGER, A. M. *et al.* Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Jove-J. Vis. Exp.*, n. 50, p. 37–40, 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3169266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 6 jan. 2017.

RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v. 16, n. 11, p. 732–749, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.89>. Acesso em: 28 out. 2018.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.*, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130024>. Acesso em: 28 out. 2018.

SAHINI, N.; BORLAK, J. Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Prog. Lipid Res.*, v. 54, p. 86–112, 2014.

SALAKOU, S. *et al.* Increased bax/bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with Myasthenia gravis. *In Vivo*, v. 21, n. 1, p. 123–132, 2007.

SAMA, V. *et al.* Effect of piperine on antihyperglycemic activity and pharmacokinetic profile of nateglinide. *Arzneimittelforschung*, v. 62, p. 384–388, 2012. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0032-1314849>. Acesso em: 6 fev. 2019.

SCHEEL, T. K. H.; RICE, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Nat. Med.* (N. Y., NY, U. S.), v. 19, n. 7, p. 837–849, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3248>. Acesso em: 28 out. 2018.

SEBASTIANI, G.; GKOUVATSOS, K.; PANTOPOULOS, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, v. 20, n. 32, p. 11033–11053, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4145747/>. Acesso em: 28 out. 2018.

SEMENKOVICH, C. F.; GOLDBERG, A. C.; GOLDBERG, I. J. Disorders of lipid metabolism. In: POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. M. (Org.). *Williams textbook of endocrinology*. 13. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2016. p. 1660–1700.

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. 729–735, 2008. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580802419772>. Acesso em: 28 out. 2018.

SHI, Q.; HOFFMAN, B.; LIU, Q. PI3K-Akt signaling pathway upregulates hepatitis C virus RNA translation through the activation of SREBPs. *Virology*, v. 490, p. 99–108, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682216000155>. Acesso em: 20 ago. 2019.

SHIMIZU, J. F. *et al.* Flavonoids from *Pterogyne nitens* inhibit hepatitis C virus entry. *Sci. Rep.*, v. 7, n. 16127, p. 1–9, 2017.

SHIN, H. J. *et al.* Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Sci. Rep.*, v. 5, n. 15798, p. 1–17, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15798>. Acesso em: 28 out. 2018.

SHIU, T. Y. *et al.* Hepatitis C virus core protein down-regulates p21Waf1/Cip1 and inhibits curcumin-induced apoptosis through microRNA-345 targeting in human hepatoma cells. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2013.

SHOBA, G. *et al.* Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.*, v. 64, p. 353–356, 1998. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-957450>. Acesso em: 25 fev. 2019.

SILVA, T. M. DA *et al.* Encapsulação de compostos bioativos por coacervação complexa. *Ciênc. Nat.*, v. 37, p. 56–64, 2015.

SINHA, R. A.; SINGH, B. K.; YEN, P. M. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v. 14, n. 5, p. 259–269, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2018.10>. Acesso em: 28 out. 2018.

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.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. *Consenso sobre hepatite C crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia*. Disponível em: <http://sbhepatologia.org.br/pdf/consenso-sobre-hepatite-cronica.pdf>. Acesso em: 28 out. 2018.

SONG, H. M. *et al.* Naringenin-mediated ATF3 expression contributes to apoptosis in human colon cancer. *Biomol. Ther.*, v. 24, n. 2, p. 140–146, 2016.

SU, W. *et al.* Crosstalk of hyperglycemia and dyslipidemia in diabetic kidney disease. *Kidney Dis.*, v. 3, n. 4, p. 171–180, 2017. Disponível em: <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29344511>. Acesso em: 28 out. 2018.

SUZUKI, M. *et al.* Anti-hepatitis C virus effect of citrus unshiu peel and its active ingredient nobiletin. *Am. J. Chin. Med.*, v. 33, n. 1, p. 87–94, 2005.

TAHERKHANI, R.; FARSHADPOUR, F. Global elimination of hepatitis C virus infection: progresses and the remaining challenges. *World J. Hepatol.*, v. 9, n. 33, p. 1239–1252, 2017. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v9/i33/1239.htm>. Acesso em: 5 fev. 2019.

TAKII, M. *et al.* Insulinotropic and anti-apoptotic effects of nobiletin in INS-1D β -cells. *J. Funct. Foods*, v. 30, p. 8–15, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.037>. Acesso em: 29 out. 2018.

TAWANI, A. *et al.* Evidences for piperine inhibiting cancer by targeting human G-quadruplex DNA sequences. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 39239, p. 1–12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep39239>. Acesso em: 6 fev. 2019.

TENG, J. *et al.* Naringenin, a common flavanone, inhibits the formation of AGEs in bread and attenuates AGEs-induced oxidative stress and inflammation in RAW264.7

cells. *Food Chem.*, v. 269, p. 35–42, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.126>. Acesso em: 7 dez. 2018.

THOMPSON, M. *et al.* Hepatotoxicity: treatment, causes and applications of medicinal plants as therapeutic agents. *J. Phytopharmacol.*, v. 6, n. 3, p. 186–193, 2017.

TIKHANOVICH, I. *et al.* Regulation of FOXO3 by phosphorylation and methylation in hepatitis C virus infection and alcohol exposure. *Hepatology*, v. 59, n. 1, p. 58–70, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26618>. Acesso em: 11 jul. 2019.

TIKHANOVICH, I.; COX, J.; WEINMAN, S. FOXO transcription factors in liver function and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 28, n. 1, p. 125–131, 2013.

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

UJINO, S. *et al.* Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 113, n. 1, p. 188–193, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26699506> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4711846/pdf/pnas.201506524.pdf>. Acesso em: 28 out. 2018.

URBACZEK, A. C. *et al.* Recombinant hepatitis c virus-envelope protein 2 interactions with low-density lipoprotein/CD81 receptors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 534–542, 2015.

VIDAL, M. N. P.; GRANJEIRO, J. M. Cytotoxicity tests for evaluating medical devices: an alert for the development of biotechnology health products. *J. Biomed. Sci. Eng.*, v. 10, n. 9, p. 431–443, 2017.

WANG, J.; WANG, C.; BU, G. Curcumin inhibits the growth of liver cancer stem cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Exp. Ther. Med.*, v. 15, n. 4, p. 3650–3658, 2018.

WANG, N. *et al.* Metformin improves lipid metabolism disorders through reducing the expression of microsomal triglyceride transfer protein in OLETF rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, v. 122, p. 170–178, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2016.10.006>. Acesso em: 28 out. 2018.

WANG, X.; HU, S.; LIU, L. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: independently or synergistically? *Oncol. Lett.*, v. 13, n. 5, p. 2867–2872, 2017.

WANG, Y.; SUN-WATERHOUSE, D. Lipoprotein lipase and its interactions with phospholipids. In: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. (Org.). *Encyclopedia of Food Chemistry*. [S.l.]: Academic Press, 2019. p. 462–467.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.*, v. 61, n. 1, p. S58–S68, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012>. Acesso em: 28 out. 2018.

WILCOX, L. J. *et al.* Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.*, v. 42, p. 725–734, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global hepatitis report, 2017*. Disponível em: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>. Acesso em: 28 out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Hepatitis C (fact sheet)*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acesso em: 28 out. 2018.

XIANG, J. *et al.* Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types? *BioMed Res. Int.*, v. 2016, n. 7343965, p. 1–6, 2016.

XU, X. *et al.* Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin. Liver Dis.*, v. 33, n. 4, p. 301–311, 12 nov. 2013. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1358523>. Acesso em: 28 out. 2018.

ZAKARYAN, H. *et al.* Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch. Virol.*, v. 162, n. 9, p. 2539–2551, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-017-3417-y>. Acesso em: 28 out. 2018.

ZAMPINO, R. *et al.* Chronic HCV infection and inflammation: clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J. Hepatol.*, v. 5, n. 10, p. 528–540, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812455/>. Acesso em: 28 out. 2018.

ZENG, W. *et al.* Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacol. Res.*, v. 135, p. 122–126, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.002>. Acesso em: 7 dez. 2018.

ZHANG, Z. *et al.* Lipophagy and liver disease: new perspectives to better understanding and therapy. *Biomed. Pharmacother.*, v. 97, p. 339–348, 2018.

ZHAO, Y. *et al.* ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol. Cancer*, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.

ZHOU, J. *et al.* Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells involves a novel mechanism mediated by clusterin. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 29521, p. 1–13, 2016.