



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

Doutorado

LORRANE DAVI BRITO

**Estudo dos Efeitos de Nanoemulsões de Curcumina e Piperina sobre a
Produção de Lipopartículas do Vírus da Hepatite C e Controle das Vias de
Apoptose Reguladas pela Fosfoproteína NS5A em Sistema *In Vitro*.**

ARAQUARA, SP

2024

LORRANE DAVI BRITO

**Estudo dos Efeitos de Nanoemulsões de Curcumina e Piperina sobre a
Produção de Lipopartículas do Vírus da Hepatite C e Controle das Vias de
Apoptose Reguladas pela Fosfoproteína NS5A em Sistema *In Vitro*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

ARARAQUARA, SP

2024

B862e Brito, Lorrane Davi.
Estudo dos efeitos de nanoemulsões de curcumina e piperina sobre a produção de lipopartículas do vírus da hepatite C e controle das vias de apoptose reguladas pela fosfoproteína NS5a em sistema *in vitro* / Lorrane Davi Brito. – Araraquara, 2024.
116 f. : il.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Imunologia.

1. Curcumina. 2. Hepatite C. 3. NS5a. 4. Nanoemulsão. 5. Piperina.
I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo dos Efeitos de Nanoemulsões de Curcumina e Piperina sobre a Produção de Lipopartículas do Vírus da Hepatite C e Controle das Vias de Apoptose Reguladas pela Fosfoproteína NS5a em Sistema In Vitro

AUTORA: LORRANE DAVI BRITO

**ORIENTADOR: PAULO INACIO DA
COSTA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. REGINA CÉLIA MOREIRA (Participação Virtual)
Centro de Virologia / Instituto Adolfo Lutz

Profa. Dra. LEANDRA ERNST KERCHE (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Funcionais / Universidade do Oeste Paulista (Unoeste)

Profa. Dra. IRACILDA ZEPPONE CARLOS (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 28 de junho de 2024

DADOS CURRICULARES

Nome: Lorrane Davi Brito

Nome em citações bibliográficas: BRITO, L. D.

Filiação: Jair José de Brito

Rosemeira Davi

Data de nascimento e local: 06/05/1992, Campinas - SP

Estado civil: Casada

Endereço: Rua Américo Brasiliense, 561

CEP: 14801-226

Telefone: (16) 997748009

E-mail: lorranedbrito@gmail.com; davi.brito@unesp.br

Resumo das qualificações: Doutoranda em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na área de imunologia, com ênfase no estudo de compostos naturais bioativos como potenciais terapias adjuvantes ao tratamento da hepatite C. Mestra em Biotecnologia pela UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase em peptídeos antimicrobianos (2020). Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste Paulista- UNOESTE, (2017).

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2020-2024

Doutoranda em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP- Campus de Araraquara

Título: ESTUDO DOS EFEITOS DE NANOEMULSÕES DE CURCUMINA E PIPERINA SOBRE A PRODUÇÃO DE LIOPARTÍCULAS DO VÍRUS DA HEPATITE C E CONTROLE DAS VIAS DE APOPTOSE REGULADAS PELA FOSFOPROTEÍNA NS5A EM SISTEMA *IN VITRO*.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa.

Bolsista Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2017-2019

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química de Araraquara.

Título: PLANEJAMENTO *IN SILICO* E SÍNTESE DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PROTEÍNA YJHX: ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE DNA TOPOISOMERASES.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Bolsista Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2014-2017

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Brasil.

Título: Avaliação in vivo de efeitos citotóxicos e protetores do extrato etanólico da casca de *Spondias purpurea* L.

Orientador: Leandra Ernst Kerche-Silva.

Bolsista do(a): Programa de Bolsas de Iniciação Científica, PROBIC, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2017

Estágio supervisionado em laboratório de análises clínicas (EXAME) – Presidente Prudente, SP.

2015-2016

Iniciação Científica no Laboratório de Imunologia Clínica, Bioquímica e Histologia da UNOESTE, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Leandra Ernst Kecher.

2016-2017

Iniciação Científica no Laboratório de Imunologia Clínica, Bioquímica e Histologia da UNOESTE, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Leandra Ernst Kecher.

2016-2018

Auxiliar de laboratório no Hospital Estadual Dr. Odilo Antunes de Siqueira de Presidente Prudente, SP

2021-2021

Sequenciamento de Sanger. (Carga horária: 8h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

VITOR, L. C., DI FILIPPO, L. P.; DUARTE, J. L.; BRITO, L.D.; LUIZ, M. T.; DUTRA, J. P.; SÁBIO, R. M.; HADDAD, F. F.; SCARIM, C. B.; COSTA, P. I.; CHORILLI, M. Characterization and *in vitro* cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells. **Chemical Papers**. v. 78, p. 2577-2587, 2024.

SANTOS, JOÃO ANTONIO OLIVEIRA; BRITO, LORRANE DAVI; DA COSTA, PAULO INÁCIO ; PIRES, ANA MARIA ; LIMA, SERGIO ANTONIO MARQUES . Development of red-luminescent hybrids as contrast agents for cell imaging: A correlation among surface, luminescence, and biological properties. **OPTICAL MATERIALS**, v. 139, p. 113759, 2023.

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; CAVALCANTE, D. M.; GOMES, A. S.; ZOCOLER, M. A.; YOSHIHARA, E.; JOB, A. E.; KERCHE, L. E. *In vivo* assessment of antioxidant, antigenotoxic, and antimutagenic effects of bark ethanolic extract from *Spondias purpurea* L. **JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART A-CURRENT ISSUES**, v. 85, p. 336-352, 2022.

FARIAS, R.L.; POLEZ, A.M.R.; SILVA, D.E.S.; ZANETTI, R.D.; MOREIRA, M.B. BATISTA, V.S.; REIS, B.L.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M.; ROCHA, F.V.; LIMA, M.A.; OLIVEIRA, A.B.; ELLENA, J.; SCARIM, C.B.; ZAMBOM, C.R.; BRITO, L.D.; GARRIDO, S.S.; MELO, A.P.L.; BRESOLIN, L.; TIRLONI, B.; PEREIRA, J.C.M.; NETTO, A.V.G. *In vitro* and *in silico* assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on NiII bearing k2N,S-donor ligands. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 121, p. 111815, 2021.

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; TARIFA, M. O.; FARAH-DA-SILVA, N. J. RODRIGUES, K. S.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; GOMES, A. S.; ZOCOLER, M. A. YOSHIHARA, E.; CAMPAROTO, M. L.; JOB, A. E.; KERCHE, L. E. Protective effects of bark ethanolic extract from *Spondias dulcis* Forst F. against DNA damage induced by Benzo[a]pyrene and Cyclophosphamide. **GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**, 2019.

CAMARA, J. A. R.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; RODRIGUES, K. S.; ZOCOLER, M. A.; KERCHE, L. E. AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS CASCAS DE *Spondias dulcis* Forst F. e *Spondias purpurea* L. **Colloquim vitae**, v. 11, p. 1-9, 2019.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

COSTA, P. I.; FILARD, E. M.; BRITO, L. D. Participação em banca de Ana Beatriz de Andrade. Padronização de metodologia para avaliação de expressão diferencial de genes associados à via de formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa*. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COSTA, P. I.; CASTILHO, B. M.; BRITO, L.D. Participação em banca de Anna Carolina Toledo Borges. Avaliação da influência da mutação I452r da glicoproteína spike do sars-cov-2, variante p.4, sobre a interação com anticorpos anti-s. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COSTA, P. I.; PINHEIRO, A. A.; BRITO, L. D.. Participação em banca de Caroline Moino. Aplicação da Citometria de Fluxo como Método Confirmatório da Infecção pelo Vírus da Hepatite C. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COSTA, P. I.; FULINDI, R. B.; BRITO, L. D.. Participação em banca de Giovanna Renelo Puopolo. Avaliação de fenótipos de ativação plaquetária e determinação

quantitativa do RNAm do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo A em concentrados de plaquetas humanas como parâmetros de qualidade do hemocomponente. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

BENITES, T. A.; MARCHETTO, R.; BRITO, L. D. A 2.0-kDa Peptide from ParD Protein as a Potential Antidote of Bacterial ParE Toxin. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRITO, L. D.; LEITE, C. E. M.; ZOCOLER, MARCOS A.; KERCHE, L. E. Avaliação *in vitro* de efeitos genotóxicos e protetores do extrato etanólico da casca de *Spondias purpurea* L. Encontro Nacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (ENEPE). 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAMARA, J. A. R.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; ZOCOLER, MARCOS A.; KERCHE, L. E. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante dos extratos etanólicos das cascas de *Spondias dulcis* forst F. e *Spondias purpurea* L. (ANACARDIACEAE). Encontro Nacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (ENEPE). 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TARIFA, M. O.; FARAH-DA-SILVA, N. J.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; CAVALCANTE, D. G. S. M; GOMES, A. S.; YOSHIHARA, E.; KERCHE-SILVA, L. E. *In vivo* assessment of mutagenic and protective effects of the bark ethanolic extract of *Spondias dulcis*. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto. Abstracts of CIFARP, 2017. v. 11. p. 1101-1101. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; ZOCOLER, M. A.; KERCHE-SILVA, L. E. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antimutagenic effects of bark ethanolic extract of *Spondias purpurea* in mice. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto. Abstracts of CIFARP, 2017. v. 11. p. 1000-1000. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; KERCHE-SILVA, L. E. Bark ethanolic extracts of *Spondias dulcis* and *Spondias purpurea* protects against oxidative stress induced by cyclophosphamide and benzo[a]pyrene in mice. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto. Abstracts of CIFARP, 2017. v. 11. p. 1191-1191. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; ZOCOLER, M. A.; KERCHE-SILVA, L. E. Cytotoxic and Mutagenic Evaluation of Bark Ethanolic Extract from *Spondias Purpurea* L. and its Influence on Benzo[A]Pyrene and Cyclophosphamide-

Induced Mutagenicity: An *in Vivo* Analysis. I International Symposium of Experimental Pathology e VI Simpósio de Patologia Experimental da UEL. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; ZOCOLER, M. A.; KERCHESILVA, L. E. Bark Ethanollic Extract from *Spondias Dulcis* Forst F. Protects Against Alterations of the Redox Status Induced by Cyclophosphamide and Benzo[A]Pyrene in Mice. I International Symposium of Experimental Pathology e VI Simpósio de Patologia Experimental da UEL. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

TARIFA, M. O.; FARAH-DA-SILVA, N. J.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; KERCHESILVA, L. E. Avaliação *in vivo* da citotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato etanólico da casca de *Spondias dulcis* Forst F. XVII Simpósio de Iniciação Científica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; KERCHESILVA, L. E. Avaliação *in vivo* de efeitos citotóxicos e protetores do extrato etanólico da casca de *Spondias purpurea* L. XVII Simpósio de Iniciação Científica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; KERCHESILVA, L. E. Avaliação do estresse oxidativo em animais tratados com extrato etanólico da casca de *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae). XVII Simpósio de Iniciação Científica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, o qual sem Ele nada seria possível. Dou graças por Seu amor e cuidado, por me sustentar, dar-me bom ânimo e me capacitar para concluir esta importante etapa em minha vida.

Ao meu marido, Igor. Por seu amor, por me incentivar, se orgulhar e se alegrar por minhas conquistas e por todo seu amparo e ajuda. Você é um presente em minha vida.

Aos meus pais, Jair e Meire por seu amor e zelo e por toda a renúncia que fizeram, sempre priorizando o meu cuidado e o dos meus irmãos.

Ao meu querido orientador, prof. Paulo Inácio, pela oportunidade concedida. Sou grata por tudo o que me ensinou, por sua paciência e dedicação.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, Aline, Anderson, Rualdo, Rafa, Elô e Bruna, por toda a ajuda nos experimentos, além de sempre alegrarem o ambiente.

À minha querida amiga Elisandra, que usou da sua experiência para me ajudar e me ensinar, por estar me acompanhando nos experimentos à noite e nos finais de semana, o que aprendi com você não tem preço.

À professora 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 gentilmente forneceu as linhagens celulares Huh 7.5 e SGR-JFH1 ao professor Paulo Inácio, o qual, sem este gesto, este trabalho não aconteceria.

À professora Iracilda Zeppone, que cedeu seu laboratório para o cultivo *in vitro*, sempre me tratou com muito carinho e fez com que eu me sentisse à vontade.

Ao professor Marlus Chorilli e seus alunos Leonardo e Jonatas, cuja colaboração foi indispensável para a realização deste estudo ao desenvolverem as nanoemulsões.

Ao Deyvis Fuentes por me auxiliar nas análises de citometria de fluxo e por tudo o que me ensinou.

À seção de pós-graduação, em especial à Claudia, Denise e Victor.

À FCFAR-UNESP e ao programa BBAF, cuja estrutura e apoio foram essenciais para a concretização deste trabalho

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

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada a todos!

Lorrane

*Ainda antes que houvesse dia,
eu Sou; e ninguém há que
possa fazer escapar das minhas
mãos; agindo Eu, quem o
impedirá?*

(Isaías 43:13)

RESUMO

A hepatite C é uma doença inflamatória crônica, causada pelo vírus HCV, o qual acomete milhares de pessoas em todo o mundo. O processo inflamatório crônico causado pela hepatite C pode acarretar em quadros clínicos mais graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular. Os tratamentos disponíveis no mercado são eficientes quanto a negatificação da carga viral, entretanto, além de causarem efeitos colaterais também são ineficazes quanto ao controle do processo inflamatório, caracterizando-se como o fator mais problemático da doença atualmente. Neste contexto, os compostos naturais bioativos (CNBs), curcumina e piperina, podem apresentar-se como uma possível alternativa, atuando como adjuvantes aos tratamentos já estabelecidos, potencializando os efeitos terapêuticos e contribuindo na diminuição dos efeitos adversos, além de controlar o processo inflamatório. O objetivo deste estudo foi analisar os mecanismos e vias moleculares importantes para a replicação e montagem viral, via SMAD 6, SMAD 7 e VAP-A, além das vias relacionadas à inibição da apoptose, HIF-1 α e p62, todas relacionadas à fosfoproteína NS5A, e dessa forma, comparar os resultados de células não infectadas (Huh 7.5) com as células infectadas por HCV (SGR-JFH1). Afim de melhorar a biodisponibilidade dos compostos naturais, foi utilizado um sistema de entrega de nanoemulsão. A fosfoproteína NS5A não respondeu aos tratamentos com CNBs, enquanto as proteínas HIF-1 α e p62 não foram detectadas por *western blotting*, impossibilitando a determinação dos resultados em células Huh 7.5 e SGR-JFH1. Através das análises de PCR em tempo real foi observado que ambos os CNBs, com ou sem nanoemulsão, diminuíram significativamente a carga viral do HCV, não apresentando diferenças significativas entre si. Além disso, também foi testado o efeito do sistema de nanoemulsão sem os compostos naturais, que gerou um aumento da carga viral em células SGR-JFH1. Os resultados demonstraram que ambos os tratamentos surtiram o mesmo efeito na análise de PCR em tempo real, em células Huh 7.5 e SGR-JFH1, sobre as expressões das SMAD 6, exceto os CNBs sem nanoemulsão, que elevou a expressão da smad em questão na SGR-JFH1. Apenas os compostos não emulsionados aumentaram a expressão da SMAD 7 e VAP -A em SGR-JFH1. A nanoemulsão sem CNBs elevou significativamente a expressão de SMAD 6, porém o mesmo não ocorreu com a SMAD 7 e VAP-A. A nanoemulsão também não apresentou efeito sobre a apoptose, enquanto que os CNBs com ou sem o sistema de nanoemulsão demonstraram entre 30 e 40% de apoptose tanto em células Huh 7.5 quanto em SGR-JFH1.

Palavras-chave: Curcumina; hepatite C; NS5a; nanoemulsão; piperina

ABSTRACT

Hepatitis C is a chronic inflammatory disease caused by the HCV virus, which affects thousands of people worldwide. The chronic inflammatory process caused by hepatitis C can lead to more serious clinical conditions, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The treatments available on the market are efficient in terms of negative viral load, however, in addition to causing side effects, they are also ineffective in controlling the inflammatory process, characterizing it as the most problematic factor of the disease today. In this context, natural bioactive compounds (NBCs), curcumin and piperine, can be presented as a possible alternative, acting as adjuvants to already established treatments, enhancing therapeutic effects and contributing to the reduction of adverse effects, besides controlling the inflammatory process. The objective of this study was to analyze the mechanisms and important molecular pathways for viral replication and assembly, via SMAD 6, SMAD 7 and VAP-A, in addition to the pathways related to the inhibition of apoptosis, HIF-1 α and p62, all related to phosphoprotein NS5A, and thus compare the results of uninfected cells (Huh 7.5) with HCV-infected cells (SGR-JFH1). In order to improve the bioavailability of the natural compounds, a nanoemulsion delivery system was used. The NS5A phosphoprotein did not respond to treatments with NBCs, while the HIF-1 α and p62 proteins were not detected with western blotting, making it impossible to determine the results in Huh 7.5 and SGR-JFH1 cells. Through real-time PCR analysis, it was observed that both NBCs, with or without nanoemulsion, significantly reduced the HCV viral load, showing no significant differences between them. Moreover, the effect of the nanoemulsion system without the natural compounds was also tested, which generated an increase in viral load in SGR-JFH1 cells. The results demonstrated that both treatments had effect in the real-time PCR analysis, in Huh 7.5 and SGR-JFH1 cells, about expressions of SMAD 6, except NBCs without nanoemulsion, which increased the expression of the smad in question in SGR-JFH1 cells. Only non-emulsified compounds increased SMAD 7 and VAP-A expression. in SGR-JFH1. The nanoemulsion system without the natural compounds was also tested, significantly increased the expression of SMAD 6, but the same did not occur with SMAD 7 and VAP-A. The nanoemulsion also had no effect on apoptosis, whereas NBCs with or without the nanoemulsion system demonstrated levels of apoptosis between 30 and 40% in both Huh 7.5 and SGR-JFH1 cells.

Keywords: Curcumin; hepatitis C; NS5a; nanoemulsion; piperine

Lista de Figuras

Figura 1. Análise filogenética do genoma do HCV	24
Figura 2. Prevalência e distribuição global dos genótipos do vírus HCV, o genótipo 7 é encontrado em apenas alguns países da África Central	25
Figura 3. Estrutura do HCV	26
Figura 4. Entrada do HCV no hepatócito.....	27
Figura 5. Esquematização do genoma do HCV e processamento da poliproteína viral.	28
Figura 6. Processo da transferência de colesterol do RE para o Golgi, mediado pela VAP-A e OSBP	31
Figura 7. Ativação da via glicolítica mediada pela HIF-1 α em hepatócitos infectados pelo HCV	39
Figura 8: Estrutura química dos curcuminoides.....	47
Figura 9: Sítios de reatividade química na curcumina	48
Figura 10: Estrutura química da piperina.....	49
Figura 11: Teste de MTT, concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos em células Huh 7.5 e SGR-JFH1.	66
Figura 12: Teste de VN, concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos em células Huh 7.5 e SGR-JFH1	68
Figura 13: Percentual de internalização da nanoemulsão em células Huh 7.5.....	69
Figura 14: Imagem do confocal da internalização da CL em células Huh 7.5.	70
Figura 15: Expressão proteica em células SGR-JFH1 e Huh 7.5 após tratamento com os CNBs e nano branca, em membranas de nitrocelulose, por western blotting	72
Figura 16: Índice de carga viral de RNA do HCV em meio intracelular e sobrenadante de células SGR após tratamentos com CNBs.....	75
Figura 17: Ensaio de PCR em tempo real para a determinação de RNA da SMAD 6, SMAD 7 e VAP-A em células Huh 7.5 e Huh 7.5 SGR.....	85
Figura 18: Análise por citometria de fluxo de eventos de apoptose em células Huh 7.5.	87
Figura 19: Análise por citometria de fluxo de eventos de apoptose em células Huh 7.5 SGR.....	89

Lista de quadros e tabelas

Tabela 1. Preparação dos compostos bioativos CL e PP preparados isoladamente em nanoemulsões.	65
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

ACC: ACC acetil-CoA carboxilase

AG: Ácidos Graxos

Akt: Serina-treonina quinase

AMK: 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase – proteína quinase ativada por 5'-adenosina monofosfato

AMPK: quinase ativada por AMP

Apo B: Apolipoproteína B

Apo E: Apolipoproteínas E

BMP: proteína morfogênica óssea

BMP-2: proteína morfogênica óssea tipo 2

BMP-4: proteína morfogênica óssea tipo 4

CDC: Centro de Controle de Doenças

CL: Curcumina

CLDN1: Tight Junction Claudina-1 – Junção da Claudina -1

CL/PP nano: curcumina e piperina em nanoemulsão

CN: Controle Negativo

CNB: Compostos naturais bioativos

CI: Controle interno

CIT: Citrato

CP: Controle Positivo

CV: Células viáveis

CypA: ciclofilina A

DAA: Direct-acting antiviral – antiviral de ação direta

DLS: Dynamic Light Scattering - espalhamento de luz dinâmica

DMC: Desmetoxicurcumina

BMC: Bisdemetoxicurcumina

DEMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium – meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco

DGAT1: Diacilglicerol aciltransferase-1

EGFR: Recetor do fator de crescimento epidermal

EphA2: Receptor de efrina A2

Erk: Quinase regulada por sinal extracelular

Fbxo7: F-box Only protein 7 – Apenas proteína F-box 1

FFAT: duas fenilalaninas em uma faixa ácida

GSK3 β : Glicogênio sintase quinase 3 β

HCC: Carcinoma hepatocelular

HCV: Vírus da hepatite C

HIF-1 α : fator 1 α induzível por hipóxia

HIF-1 β : fator 1 β induzível por hipóxia

HKI: Hexoquinase I

HKII: Hexoquinase II

HMG-CoAR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase

HSPG: proteoglicanos de sulfato de heparano

HVR1: regiões hipervariáveis 1

HVR2: regiões hipervariáveis 2

IP: Iodeto de propídeo

ISDR: região determinante da sensibilidade ao interferon

I-SMADS: SMADS inibitórias

IPD: Índice de polidispersão

JFH1: Hepatite japonesa fulminante -1

JNK: Quinase N-terminal c-Jun

LD: Lipid droplet – gotícula lipídica

LDL: Low density lipoprotein – Lipoproteína de baixa densidade

LDLR: Receptor de LDL

LTP: Proteína de transferência de lipídeos

M: Molar

MCS: membrane contact sites – Locais de contato das membranas

ML: Mililitro

MTP: Microsomal triglyceride transfer protein – Proteína microssomal transferidora de triglicerídes

NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B

Nir2: Receptor de interação com o domínio N-terminal

NTR- Região não traduzida

μM: Micromolar

OCLN: Ocludina

OCLN-1: Ocludina tipo 1

ORF: Open Reading Frame – Fase de leitura Aberta

OSBP: Proteína de ligação ao oxisterol

OxPhos: oxidative phosphorylation - fosforilação oxidativa

p62: Sequestosome-1

PDH: piruvato desidrogenase

PDP: Piruvato desidrogenase fosfato

PHD: prolil hidroxilases

PDK: PDH quinase

PEGIFN- α : Interferon peguilado alfa

PEGIFN- β : Interferon peguilado beta

PINK1: Serina-treonina quinase

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase

PI4KIII α : Fosfatidilinositol-4 quinase III alfa

PI4P: Fosfoinosítídeo

PP: Piperina

PZ: Potencial zeta

p38 MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno p38

RAV: Variante associada à resistência

RdRp: RNA-polimerase RNA-dependente

RE: Retículo Endoplasmático

RER: retículo endoplasmático rugoso

RTK: Receptor Tirosina - quinase

RT-qPCR: Reação da Polimerase em Cadeia da Transcriptase Reversa

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SMURF: fator regulador de ubiquitina de proteínas smads

SRB1: Receptor de classe B scavenger tipo I

SREBP: Sterol regulatory element-binding protein – proteína de ligação ao elemento regulador de esterol

TAK1: Quinase 1 associada a TGF- β

TG: Triglicerídeos

TGF- β : fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

T β RI: Receptores TGF- β tipo I

T β RII: Receptores TGF- β tipo II

VAP-A: Proteína de membrana associada à vesícula A

VAP-B: Proteína de membrana associada à vesícula B

VDAC: voltage-dependent anion channel – Canal aniônico voltagem-dependente

VLDL: Very low density lipoprotein – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. Introdução.....	22
1.1 Epidemiologia do vírus da hepatite C	22
1.2 Genótipos do HCV e sua distribuição global.....	23
1.4 Entrada do vírus no hepatócito	26
1.5 Replicação do RNA viral.....	27
1.6 Montagem da partícula viral	29
1.6.1 Proteína core	33
1.6.2 Glicoproteínas do envelope viral E1 e E2.....	33
1.6.3 Proteína p7	34
1.6.4 Proteína NS2	34
1.6.5 Proteína NS3	34
1.6.6 Proteína NS4A.....	34
1.6.7 Proteína NS4B	34
1.6.8 Proteína NS5A	35
1.6.9 Proteína NS5B	39
1.7 Variabilidade Genética do HCV	40
1.8 Tratamento da hepatite C e seus desafios	41
1.9 Propriedades da Curcumina.....	46
1.10 Propriedades da Piperina	48
2. Objetivos.....	50
2.1 Objetivo Geral	50
2.2 Objetivos Específicos	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Compostos Naturais Bioativos em nanoemulsões.....	51
3.2 Cultura Celular	53
3.3 Viabilidade celular pelo ensaio de MTT	53
3.4 Ensaio de retenção do corante vermelho neutro	54
3.5 Teste de Internalização por Citometria de Fluxo.....	55
3.6 Confocal.....	56
3.7 Análise qualitativa das proteínas NS5A, p62 e HIF-1 α por <i>Western Blotting</i>	57
3.8 Quantificação da expressão da carga viral do HCV por <i>qPCR</i>	59
3.9 Quantificação da expressão das I-SMADS, VAP-A por <i>qPCR</i>	61
3.10 Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo	62
3.11 Análise Estatística	63
4. Resultados e discussão	64

4.1	Preparo das nanoemulsões.....	64
4.2	Análise de MTT	65
4.3	Análise do Vermelho Neutro	67
4.4	Teste de Internalização por Citometria de Fluxo.....	68
4.5	Análise Confocal	70
4.6	Análise qualitativa das proteínas NS5A, p62 e HIF-1 α por <i>Western Blotting</i>	71
4.7	Análise quantitativa de PCR em tempo real (<i>qPCR</i>) da carga viral.....	74
4.8	Análise quantitativa de PCR em tempo real (<i>qPCR</i>) das I-SMADS e VAP-A.	76
4.9	Apoptose e Necrose	85
5.	Conclusões.....	91
6.	REFERÊNCIAS	94

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do vírus da hepatite C

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. Em 2015, o Observatório Polaris foi criado para monitorar e prever a carga de doenças da hepatite C e B, foram coletados dados de 100 países, representando mais de 85% da população mundial (Roudot-Thoraval, 2021).

Com base nos dados coletados pelo Observatório Polaris, o Centro de Controle de Doenças (CDC) estima que em 2019 a hepatite C crônica acometeu 62 milhões de pessoas. Neste mesmo ano, a prevalência global da doença foi em torno de 1% da população (World Health Organization, 2017; Manns *et al.*, 2017; Center for Disease Control and Prevention, 2023).

A infecção aguda por hepatite C leva ao desenvolvimento de hepatite crônica em 70 a 80% dos casos, com risco de gerar quadros clínicos mais graves, aproximadamente 10 a 20% dos indivíduos cronicamente infectados desenvolvem complicações, como cirrose e carcinoma hepatocelular em um período de 20 a 30 anos (Roudot-Thoraval, 2021; Roger *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de tais complicações, favorecido pelo diagnóstico tardio, deve-se ao fato de se tratar de uma doença silenciosa. Além disso, outro grande obstáculo para o diagnóstico precoce, o qual ocorre sobretudo em países com recursos limitados, são os custos das ferramentas moleculares, que são essenciais para diagnosticar e acompanhar a doença (Roger *et al.*, 2021).

Infelizmente, no Brasil a baixa taxa de diagnóstico para hepatite C também é uma realidade. Os dados epidemiológicos no Brasil para hepatites virais, além de escassos, são 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 2000 a 2022 foram registrados 432.781 mil casos em que pelo menos um dos marcadores anti-HCV e RNA-HCV foram detectados (Ministério da Saúde, 2023). Tais informações revelam que o êxito em combater esta doença não se concentra em apenas desenvolver tratamentos cada vez mais eficazes, pois um dos grandes desafios para alcançar a erradicação global da hepatite C continua sendo a redução do subdiagnóstico (Roger *et al.*, 2021).

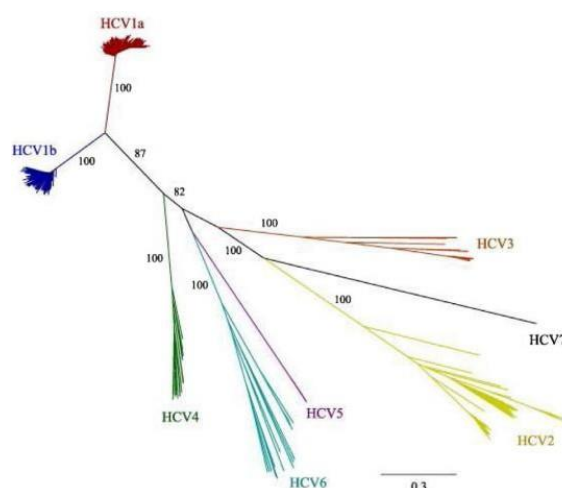
1.2 Genótipos do HCV e sua distribuição global

A hepatite C é causada pelo vírus HCV, cujo genoma é extremamente instável, sendo relatado como quasispecie viral (Tsukiyama-Kohara, 2017). O termo quasispecie viral refere-se a uma estrutura populacional que apresenta altos índices de genomas variantes, denominados espectros mutantes, enxames mutantes ou nuvens mutantes. Devido à alta taxa de mutação, as cepas variantes surgem continuamente à medida que a replicação viral prossegue (Domingo; Perales, 2019).

As cepas de HCV são classificadas em sete genótipos reconhecidos e 67 subtipos já confirmados (Weller *et al.*, 2017). Os genótipos são indicados por um número arábico de 1 a 7, acompanhado por uma letra minúscula para especificar o subtipo (Roger *et al.*, 2021). A classificação é feita com base em análises filogenéticas (Figura 1) e na sequência de genomas virais inteiros (Weller *et al.*, 2017).

Os genótipos possuem uma variação na sequência de nucleotídeos entre 25 a 35% e os subtipos diferem entre si em cerca de 15 a 25% (Simmonds *et al.*, 2017). Em apenas um único hospedeiro infectado pelo HCV é possível encontrar um pool de quasiespécies (Farci; Bukh; Purcell, 1997; Tsukiyama-Kohara; Kohara, 2017).

Figura 1. Análise filogenética do genoma do HCV

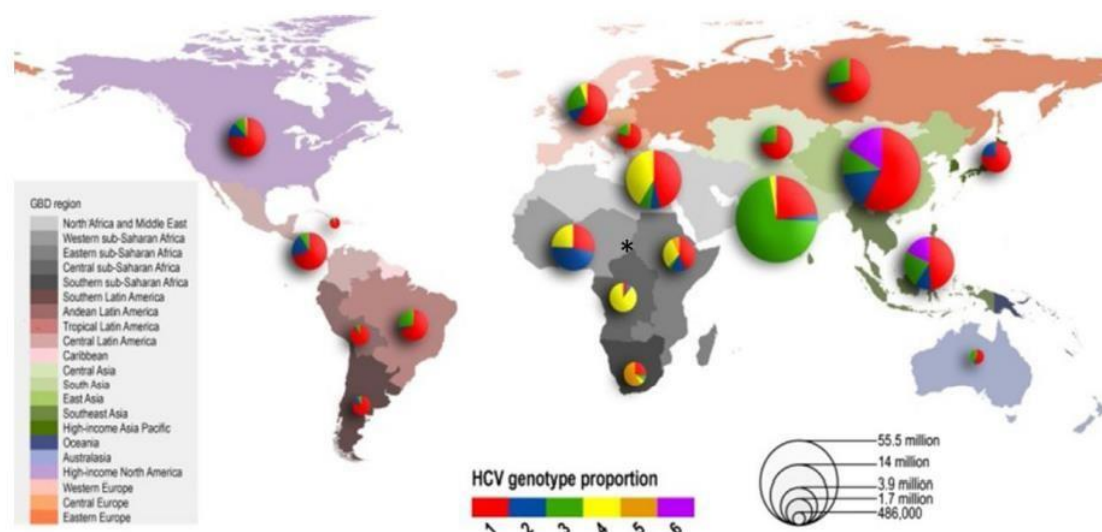


Fonte: Cuypers *et al.*, 2015.

A distribuição geográfica dos genótipos do HCV é complexa, pois sua prevalência muda de acordo com o país (Weller *et al.*, 2017). Contudo, foi constatado que alguns subtipos, especificamente 1a, 1b, 2a e 3a, são amplamente distribuídos em todo o mundo e, proporcionalmente, são os mais comuns em infecções por HCV (Weller *et al.*, 2017). O genótipo 1 tem demonstrado ser o mais prevalente globalmente (46%), seguido pelo genótipo 3 (Gower *et al.*, 2014; Messina *et al.*, 2015). Os genótipos 2, 4, 5 e 6 representam menos de 10% das infecções, já o genótipo 7 foi registrado poucos casos na África Central (Smith *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2015) Figura 2.

O genótipo 1 é o mais prevalente na maioria dos países da Europa e América do Norte, seguido pelos genótipos 2 e 3. O genótipo 2 é mais frequente na África Central, enquanto que, o genótipo 3 possui uma maior prevalência de infecções na Índia, Paquistão, Tailândia entre outros países asiáticos, sendo também encontrado em países do norte da Europa. O genótipo 4 encontra-se, principalmente, na África Central e no Oriente Médio, já o genótipo 5 é comum na África Meridional. O genótipo 6 possui uma alta prevalência no leste e sudeste da Ásia, encontrado principalmente no Laos e no Vietnã (Messina *et al.*, 2015; Roger *et al.*, 2021). A figura 2 ilustra a distribuição geográfica dos diferentes genótipos para melhor compreensão.

Figura 2. Prevalência e distribuição global dos genótipos do vírus HCV, o genótipo 7 é encontrado em apenas alguns países da África Central.



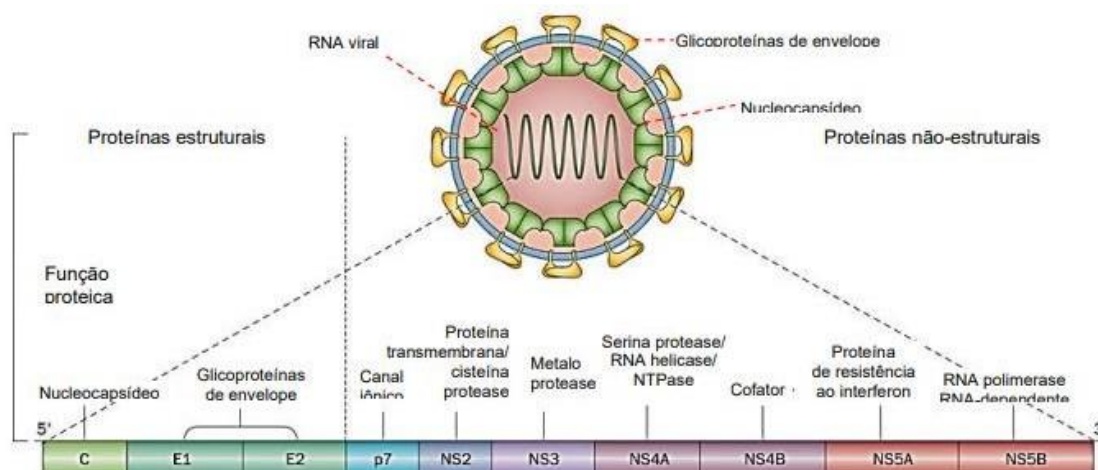
Fonte: ROGER et al., 2021.

1.3 Estrutura do vírus da hepatite C

O HCV é um pequeno vírus da família Flaviviridae, um vírus envelopado cujo genoma é composto de fitas de RNA simples de polaridade positiva com aproximadamente 9,6 kb de extensão (Tsukiyama-Kohara, 1992).

Para que ocorra a replicação e tradução do vírus o genoma do HCV codifica somente uma fase de leitura aberta (ORF) de 3010 aminoácidos flanqueados por 5' e 3' de regiões não traduzidas (NTRs) (Tanaka, 1995; Tsukiyama-Kohara, 1992). O 5' NTR contém um local interno de entrada do ribossoma, denominada IRES. A tradução da proteína do HCV começa a partir do 5-UTR IRES produzindo uma única poliproteína, o qual a partir dela gera-se 10 proteínas (Tsukiyama-Kohara, 1992).

A poliproteína é processada por dois tipos de proteases, as celulares e as virais, que geram, respectivamente, as proteínas estruturais, que formam as partículas virais (core e envelope de glicoproteínas E1 e E2) e as proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Tanaka, 1995; Tsukiyama-Kohara, 1992; Tang; Gris , 2009) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura do HCV

Fonte: Adaptado de Morales; Fabrizi, 2015.

1.4 Entrada do vírus no hepatócito

A transmissão do vírus HCV ocorre pela via parenteral (Kupfer, 2016), ao atingir o fígado o vírus passa pelo espaço de Disse, passando pelo endotélio fenestrado onde entra em contato com a superfície basolateral dos hepatócitos (Gerold; Pietschmann, 2014; Zeisel; Felmlee; Baumert, 2013).

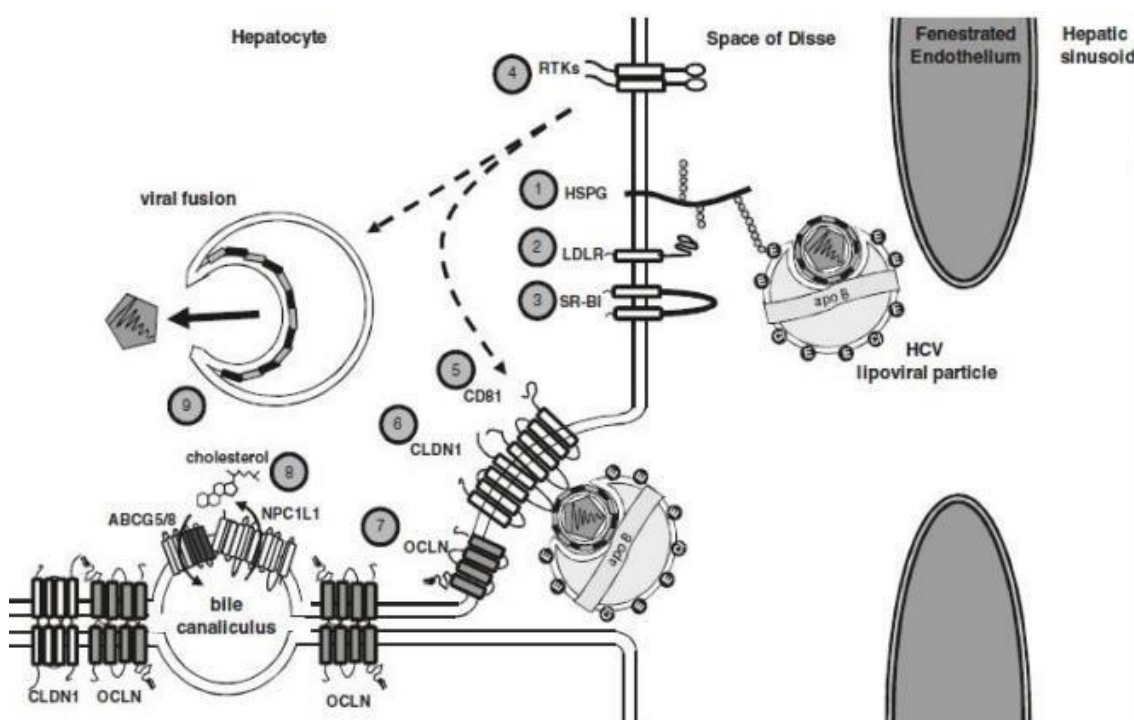
O vírus do HCV liga-se a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), associadas a proteína apolipoproteína (Apo) B-100 e apolipoproteínas E e C, permitindo sua circulação na corrente sanguínea (Zeisel; Felmlee; Baumert, 2013).

O HCV possui afinidade com diversos receptores de membrana, que possibilita a invasão à célula. Os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG), são expressos na maioria das superfícies celulares dos mamíferos. Os HSPGs se ligam a várias proteínas extracelulares, moléculas de adesão e fatores de crescimento, além de mediar a ligação e a entrada de uma variedade de vírus, incluindo o HCV (Zeisel; Felmlee; Baumert, 2013; Kardashian; Pockros, 2017).

Neste caso, o HSPG se liga à HVR1 da glicoproteína E2, possibilitando a entrada do HCV à célula. O receptor LDL (LDLR), devido à afinidade, liga-se à apolipoproteína E da partícula viral. Outros receptores celulares, responsáveis pela permeabilidade do HCV em hepatócitos, são: a tetraespanina CD81, a proteína tight junction claudina-1 (CLDN1), ocludina (OCLN) e o receptor de classe B scavenger tipo I (SRB1) (Bartenschlager; Lohmann; Penin, 2013;

Kupfer, 2016; Gerold; Pietschmann, 2014; Zeisel; Felmlee; Baumert, 2013; Dubuisson; Cosset, 2014). Os receptores de tirosina-cinases (RTK), como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e o receptor de efrina A2 (EphA2), também são responsáveis pela intermediação da entrada do vírus a CD81 e a CLDN1, que geram a fusão da membrana com as glicoproteínas do envelope viral (Figura 4) (Bartenschlager; Cosset; Lohmann, 2010; Gerold; Rice, 2011; Lindenbach; Rice, 2013; Ujino *et al.*, 2016; Urbaczek *et al.*, 2015).

Figura 4. Entrada do HCV no hepatócito



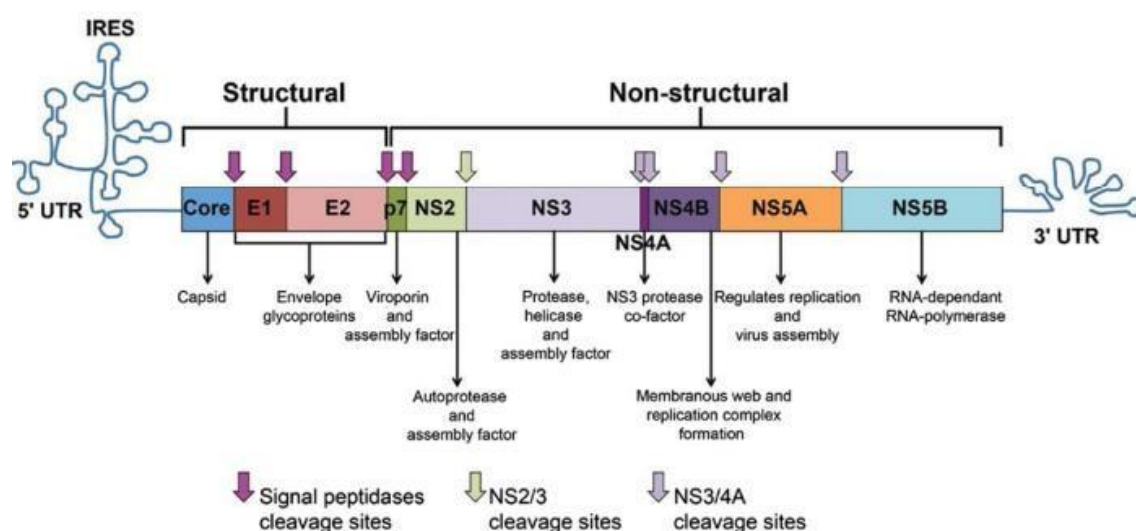
Fonte: Tese João Pedro Marques Rodrigues Barros, 2017.

1.5 Replicação do RNA viral

A entrada do HCV na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina, que confere baixo pH endossomal, promovendo a fusão do vírus à membrana do endossoma e posterior desenvolvimento viral. O RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido via IRES na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER). O genoma de RNA, de sentido positivo, é replicado por uma fita intermediária negativa, que ao ser traduzido produz novas proteínas e novos moldes de RNA que serão usados para futuras replicações e montagem de novas partículas virais (Tsukiyama-Kohara, 1992).

Como já mencionado, a tradução do RNA viral produz uma única poliproteína, o qual a partir dela gera-se 10 proteínas (Tsukiyama-Kohara, 1992). A poliproteína é processada, gerando as proteínas estruturais, que formam as partículas virais (core e envelope de glicoproteínas E1 e E2) e as proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Tanaka, 1995; Tsukiyama-Kohara, 1992; Tang; Gris , 2009). O processo de replicação ocorre através da ação das proteínas NS3/4A, NS4B, NS5A e NS5B, sendo que a RNA polimerase dependente de RNA viral NS5B é a enzima fundamental para a síntese de RNA (Lohmann, 2013).

Figura 5. Esquematização do genoma do HCV e processamento da poliproteína viral.



Fonte: ABDEL-HAKEEM, M.; SHOUKRY, N, 2014

Legenda: O genoma do HCV é composto por uma ORF flanqueado por 5' e 3' UTRs. A tradução mediada por IRES gera uma poliproteína que é processada em 10 proteínas virais. Peptidases celulares clivam E1, E2 e p7 da poliproteína (setas rosas). A protease NS2-NS3 se auto-cliva (seta verde). A protease NS3, auxiliado por seu cofator ligado à membrana, NS4A, cliva as proteínas restantes NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (setas violetas).

Durante o processamento da poliproteína do HCV (Figura 5), as peptidases clivam as proteínas estruturais, ou seja, core, E1, E2 e a junção p7/NS2. A clivagem entre NS2 e NS3 é mediada pela cisteína protease NS2. J    NS3 possui a função de clivar a NS4A e NS4B. A NS4A associa-se ao N-terminal de NS3, formando um complexo de protease NS3/4A, que tem por função clivar as junções NS4B/5A e NS5A/5B (Abdel-Hakeem; Shoukry, 2014).

1.6 Montagem da partícula viral

O vírus do HCV, durante a infecção, prepara um sítio de replicação, denominada 'membranous web', uma estrutura de vesículas membranosas desenvolvida pela NS4B. Durante a montagem da partícula viral é necessário que a cadeia de RNA seja liberada da 'membranous web' juntamente com a NS5A. Em seguida, o RNA viral é transportado pela proteína TIP47 para se associar às gotículas lipídicas (LD - do inglês lipid droplets), ricas em proteínas core (necessárias para a formação do capsídeo) e triglicerídeos, que se juntam a essa estrutura transportados pela diacilglicerol aciltransferase-1 (DGAT1). A ApoE também compõe essa estrutura ao se ligar com a proteína NS5A (Shah, *et al.*, 2014; Felmlee, *et al.*, 2013).

A última etapa da montagem do capsídeo é a fusão da partícula viral à membrana do retículo endoplasmático, alcançando o lúmen e se infiltrando na síntese de VLDL (Felmlee, *et al.*, 2013). Ou seja, o HCV sai da célula pela via de secreção do VLDL, circulando na corrente sanguínea em complexo com as lipoproteínas do hospedeiro (Gerold; Pietschmann, 2014).

Assim como diversos processos de síntese, a produção de VLDL depende do transporte de moléculas de uma organela para outra. O transporte lipídico inter e intracelular pode partir de um processo vesicular ou não vesicular. O modo não vesicular ocorre através de transferência lipídica, envolvendo a troca de lipídios monoméricos entre as membranas intracelulares e organelas. Este é o mais comum, pois ao contrário do processo vesicular, é energeticamente eficiente e não requer reorganização do citoesqueleto e cascatas de sinalizações complexas (Das; Nozaki, 2018).

As proteínas de transferência de lipídios (LTPs) são uma classe de proteínas que facilitam o transporte de moléculas de uma organela para outra (Chiapparino *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2019), formando locais de contato entre suas membranas (MCSs) (Hanada *et al.*, 2003; D'angelo *et al.*, 2007; D'angelo *et al.*, 2013; Mesmin *et al.*, 2013).

Por meio das LTPs organelas se associam promovendo a troca de lipídios, como, por exemplo, a comunicação entre o retículo endoplasmático (RE) a outras organelas, como o aparelho de Golgi, mitocôndrias e membrana

plasmática (Achleitner *et al.*, 1999; Csordás *et al.*, 2006; Elbaz; Schuldiner, 2011; Helle *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2013).

O MCS é composto por proteínas que geram e estabilizam as interações proteína-proteína ou proteína-lipídio entre as membranas das organelas (Giorgi *et al.*, 2009; Lev, 2010). A proximidade entre a membrana doadora e receptora que ocorre nos MCSs reduz a distância de difusão das LTPs e acelera a transferência lipídica intermembrana (Peretti *et al.*, 2020).

A proteína de ligação ao oxisterol (OSBP) e as proteínas relacionadas à OSBP (ORPs) constituem uma grande família de proteínas de transferência de lipídeos (LTPs) (Suchanek *et al.*, 2007).

Vários ORPs transportam lipídios específicos de maneira direcional devido à contratroca e hidrólise do fosfoinosítídeo (PI4P). OSBP contém um motivo de duas fenilalaninas em uma faixa ácida (FFAT) que se liga a VAP-A (proteína de membrana associada à vesícula A) e impulsiona a troca de colesterol/PI4P no RE-Golgi MCS (Avula *et al.*, 2021).

A OSBP pode se ligar tanto ao colesterol quanto ao 25-hidroxicoolesterol. A transferência de esteróis por OSBP é um processo cíclico e envolve a troca de esteróis do RE pelo PI4P em membranas opostas (Figura 6) (Ghai *et al.*, 2017). A presença de PI4P nas membranas doadoras pode estimular a atividade de OSBP (Ridgway *et al.*, 1992).

A VAP-A e seu homólogo VAP-B (proteína de membrana associada à vesícula B) são proteínas transmembrana do RE que interagem com aproximadamente cem moléculas citosólicas, reconhecendo o FFAT, ou motivos semelhantes, em proteínas parceiras (Avula *et al.*, 2021). O amplo espectro de interação da VAP-A com outras moléculas e seu envolvimento em muitos MCS faz dela um importante alvo para maiores estudos.

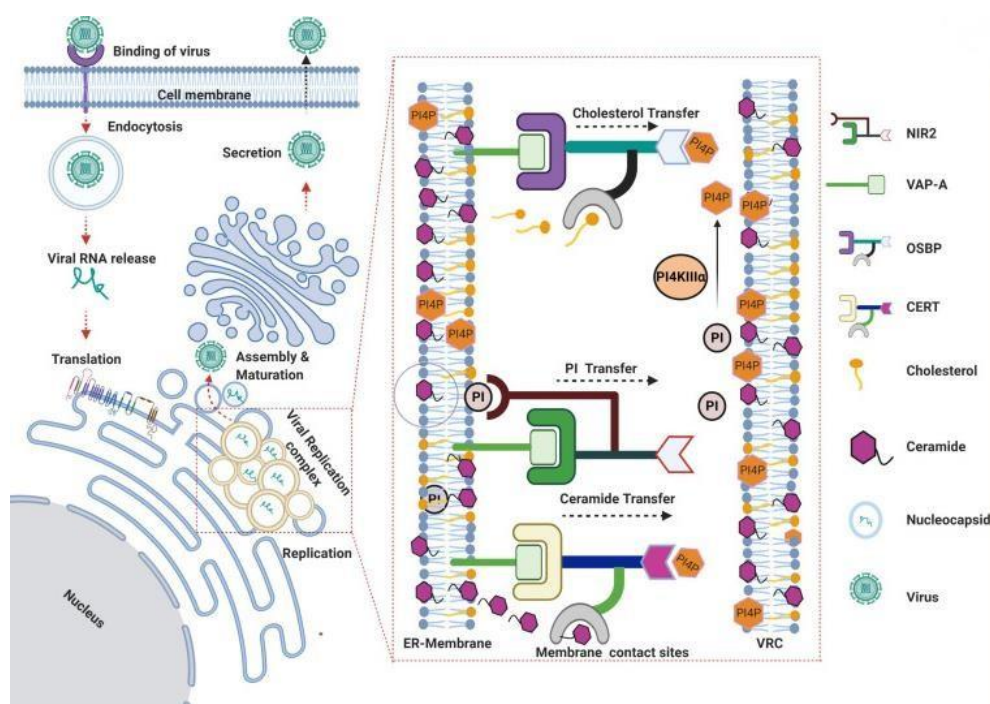
Para a formação da 'membranous web' o HCV explora vários fatores do hospedeiro para promover o fornecimento de colesterol no sítio de replicação. O HCV aumenta a regulação da lipogênese e diminui a secreção lipídica e a β -oxidação (Syed *et al.*, 2010). A proteína NS5A do HCV interage com a fosfatidilinositol-4 quinase III alfa (PI4KIII α), localizada no RE, e estimula sua atividade (Berger *et al.*, 2009; Reiss *et al.*, 2011), a ativação de PI4KIII α resulta em níveis aumentados de PI4P nas membranas do RE. Estudos mostraram que o knockdown da PI4KIII α reduz os níveis de PI4P, mediada por HCV-NS5A, o

qual altera a estrutura da rede membranosa e consequentemente afeta a replicação do HCV (Reiss *et al.*, 2011).

O HCV, ao elevar os níveis PI4P, faz com que a OSBP se ligue à VAP-A, que esta ancorada na membrana do RE. Quando a PI4P se liga ao OSBP é catalisada a troca de colesterol e PI4P, entre o RE e o complexo de Golgi. A NS5A parece interagir com a VAP-A e o OSBP próximo ao complexo de Golgi, demonstrando um papel crucial na secreção do vírus (Avula *et al.*, 2021; Amako *et al.*, 2009) (Figura 6).

A Figura 6 ilustra a transferência de colesterol pela OSBP, além da transferência de fosfoinosítídeo (PITP) pelo Nir2 (receptor de interação com o domínio N-terminal) e a transferência de ceramida pela proteína transportadora de lipídio CERT do RE para o complexo de Golgi.

Figura 6. Processo da transferência de colesterol do RE para o Golgi, mediado pela VAP-A e OSBP.



Fonte: Avula *et al.*, 2021.

Estudos mostraram que a fosforilação de NS5A pode modular sua capacidade de interagir com VAP-A. Evans; Rice; Goff (2004), propuseram um modelo, no qual o NS5A hiperfosforilado representa uma conformação “fechada”, incapaz de se associar com a VAP-A ou outras proteínas necessárias

para a replicação do RNA viral. O estado de fosforilação da NS5A talvez atue como um interruptor, regulando profundamente o ciclo do HCV. Não se sabe ao certo quais quinases participam da fosforilação da NS5A, o que torna necessário estudos mais aprofundados, cujo o conhecimento possivelmente forneceria novos alvos terapêuticos (Evans; Rice; Goff, 2004).

Em hepatócitos sadios a síntese e absorção de colesterol é regulada de acordo com os níveis intracelulares. Quando os níveis de colesterol intracelular são satisfatórios a célula interrompe a absorção de colesterol exógeno, provenientes da alimentação, e também diminui a síntese de colesterol endógeno, triglicérides, níveis da enzima HMG-CoAR (3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase), redução da enzima ACC (acetil-CoA carboxilase), que por sua vez diminui os níveis de malonil-CoA e reduz os ácidos graxos livres e a síntese de VLDL (Musso; Cassader; Gambino, 2016).

Em hepatócitos infectados com o vírus HCV esta regulação não acontece, parte disto se dá pelas I-SMADS, importantes no processo de absorção de LDL por hepatócitos infectados pelo HCV, atuando no estágio inicial da ligação viral aos receptores de membrana (Zhang *et al.*, 2017).

As I-SMADS pertencem à família de proteínas SMAD, importantes transdutores de sinal e reguladores-chave da proliferação, diferenciação, migração, apoptose e resposta imune (Massague, 1998). Composta por oito tipos, o qual 5 deles (SMAD 1, 2, 3, 5 e 8) são R-SMADS, a co-smad (SMAD 4), todos contendo um domínio de fosforilação que pode ser ativado pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), uma proteína reguladora que controla a proliferação, diferenciação celular, entre outras funções (Zhang *et al.*, 2017; Guo; Wang, 2009).

As I-SMADS (SMAD 6 e 7) são induzidas por diversas vias (Derynck; Zhang, 2003), mas principalmente pela via de sinalização TGF- β e as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), tal via é essencial no desenvolvimento embrionário, na homeostase do tecido adulto e na patogênese de diversas doenças. A principal função das I-SMADS é inibir a ativação induzida por ligantes de proteínas SMAD na via de sinalização TGF- β (Hayashi *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2003).

As I-SMADS podem atuar como coativadores transcricionais (Glesne; Huberman, 2006; Hong *et al.*, 2013), sua extremidade C-terminal tem um

domínio MH2, que é de fato conservado entre todas as proteínas SMADs. Estudos indicam que este domínio responde à estimulação de TGF- β ou BMP, formando um complexo com potencial de ativação transcricional (Zhang *et al.*, 1996). Segundo Zhang *et al.*, (1996), apenas as I-SMADs possuem atividades reguladoras de transcrição na expressão do HSPG em hepatócitos, receptor essencial para a ligação e entrada do HCV.

Por mais que as SMADS 6 e 7 sejam induzidas por diferentes vias, foi descoberto que apenas a sinalização pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é responsável pela indução de I-SMAD na infecção pelo HCV. Diversos trabalhos mostram que a via NF- κ B tem sido implicada em múltiplas infecções virais (Marianneau *et al.*, 1997). Segundo os resultados de Zhang *et al.*, (2017), a via I-SMAD-HSPG é induzida pela infecção do HCV através da ativação do NF- κ B para facilitar a propagação viral, enquanto que as demais SMADS são dispensáveis para este fim.

1.6.1 Proteína core

A proteína core do HCV é uma proteína estrutural constituída por um nucleocapsídeo, o qual possui diversas funções, entre elas a ligação do HCV ao hepatócito, modulação imunológica, sinalização celular e autofagia (Kim; Chang, 2013).

Além de formar o envelope viral, fazendo parte da montagem da partícula do HCV, a proteína core também possui função reguladora na tradução do RNA viral. Além destas funções, já amplamente conhecidas na literatura, estudos mostram que a core participa de diversas respostas celulares como sinalização celular, processo de apoptose, metabolismo lipídico e carcinogênese (Kupfer, 2016).

1.6.2 Glicoproteínas do envelope viral E1 e E2

As glicoproteínas E1 e E2, assim como a core, também possui uma função estrutural, são glicoproteínas glicosiladas que envolvem o envelope viral. Possuem funções essenciais ao ciclo do HCV, desde a entrada do vírus e fusão com a membrana do endossoma até a montagem da partícula infecciosa. (Moradpour; Penin, 2013).

1.6.3 Proteína p7

A proteína p7 é uma proteína de membrana responsável por formar um canal iônico no retículo endoplasmático. Possui um papel crucial na montagem da partícula viral, atuando juntamente com a proteína core, E1, E2 e NS2 (Moradpour; Penin, 2013; Kupfer, 2016). Estudos tem chegado à conclusão que a p7 suprime a acidificação do citosol, oriunda das organelas intracelulares, protegendo as proteínas virais de mudanças conformacionais provocadas pelo baixo pH (Moradpour; Penin, 2013).

1.6.4 Proteína NS2

A NS2 é uma autoprotease com a função de mediar a clivagem entre a NS2 e NS3 (Kim; Chang, 2013). Após a clivagem a protease interage com as glicoproteínas E1 e E2 e os complexos NS3/NS4A e assume um importante papel no estágio inicial na montagem de novas partículas virais (Kupfer, 2016).

1.6.5 Proteína NS3

A NS3 é uma proteína de 70 kDa, contendo uma serina protease na porção N-terminal e uma helicase em dois terços da porção C-terminal (Moradpour; Penin, 2013). A principal função da NS3 é o processamento da poliproteína do vírus, o qual cliva a jusante de NS3 em 4 locais, são estes: entre NS3 / NS4A, NS4A / NS4B, NS4B / NS5A, NS5A / NS5B) (Kim; Chang, 2013). Para a protease estar em plena atividade é necessário a utilização da NS4A como cofator enzimático. Já a outra porção da NS3, que corresponde à helicase, é responsável por se ligar e descondensar o genoma do RNA viral durante o processo de replicação (Kupfer, 2016).

1.6.6 Proteína NS4A

A NS4A é uma proteína pequena, que além de atuar como um cofator enzimático para a NS3, mencionado no item 1.6.5, também fornece um aumento significativo na estabilidade desta protease (Kupfer, 2016).

1.6.7 Proteína NS4B

Outra proteína de membrana é a NS5B, essencial para a síntese da 'membranous web', um rearranjo membranoso específico, que consiste na

formação de teias membranosas que geram o complexo de replicação do RNA viral. Além disso, a interação da NS4B com outras proteínas não-estruturais virais, também demonstrou ser fundamental na montagem do HCV (Moradpour; Penin, 2013).

1.6.8 Proteína NS5A

A NS5A é uma fosfoproteína multifuncional de 447 aminoácidos, crítica para a replicação e montagem viral, porém suas funções ainda não estão completamente elucidadas (Ross-Thriepeland; Harris, 2015). A NS5A pode ser encontrada basalmente fosforilada (56kDa) ou na forma hiperfosforilada (58 kDa), sendo esta última um importante regulador do ciclo do HCV (Macdonald; Harris, 2004; Reed; Xu; Rice, 1997; Jassey *et al.*, 2019).

A fosfoproteína consiste em uma hélice anfipática N-terminal e três domínios (domínios I, II, III) separados por sequências de baixa complexidade LCS I e LCS II. O domínio I é altamente estruturado, enquanto os domínios II e III são intrinsecamente desordenados. O domínio I atua na dimerização da NS5A, região fundamental no processo de ligação do RNA e replicação viral (Lim *et al.*, 2012). O domínio II interage com a proteína celular ciclofilina A (CypA), processo necessário para a ligação da fosfoproteína ao RNA viral (Kandangwa; Liu, 2019).

É sabido que a NS5A é a grande responsável pela resistência a terapias a base de interferon. O domínio II da fosfoproteína contém uma região chamada região determinante da sensibilidade ao interferon (ISDR), na qual mutações específicas na região y86h geram a resistência ao medicamento (Enomoto *et al.*, 1996).

Curiosamente, foi descoberto o envolvimento da NS5A no processo de mitofagia (Siu *et al.*, 2016), uma forma específica de autofagia, o qual direciona mitocôndrias disfuncionais aos lisossomos para serem degradadas (Lemasters, 2005).

A despolarização mitocondrial dá início ao processo de mitofagia, induzindo a serina-treonina quinase (PINK1) a ligar-se à membrana mitocondrial externa e através da Fbxo7 (F-box Only protein 7) a proteína E3 ligase Parkin é fosforilada, permitindo seu deslocamento para a mitocôndria (Burchell *et al.*, 2013). A Parkin é responsável pela ubiquitinação de proteínas mitocondriais como, por exemplo, a VDAC (voltage-dependent anion channel), que leva ao recrutamento da p62

(Sequestosome-1), BNIP3 (BCL2 Interacting Protein 3) e LC3, que gera o engolfamento da organela pelo autofagossoma (Ashrafi; Schwarz, 2013).

A p62 é uma proteína citoplasmática multifuncional, uma molécula reguladora que atua como um receptor de autofagia seletivo para a degradação de substratos ubiquitinados, carregando organelas disfuncionais para os autofagossomos (Lamark; Svenning; Johansen, 2017). Durante o processo de autofagia a p62 também é degradada, pois o seu acúmulo é tóxico à célula, o que faz desta proteína um dos principais marcadores de degradação autofágica (Klionsky *et al.*, 2016).

Estudos comprovam que a ablação da p62 inibe completamente a depuração de mitocôndrias danificadas (Geisler *et al.*, 2010). Segundo o estudo de Jassey *et al.*, 2019, foi comprovado que a NS5A induz o influxo de cálcio para as mitocôndrias e acentua a produção de ROS, que são fatores ligados a perda do potencial de membrana mitocondrial, o qual precede o processo de mitofagia (Gong *et al.*, 2001). Nesse estudo também foi observado que a superexpressão de NS5A resultou em uma degradação dependente do tempo de p62, indicando a conclusão da autofagia. Com base nesses resultados conclui-se, portanto, que NS5A realmente induz o fluxo autofágico (Jassey *et al.*, 2019).

É amplamente conhecido que a infecção por HCV induz à lesão mitocondrial (Ripoli *et al.*, 2010), sendo comum biópsias de hepatócitos infectados apresentarem sinais de mitocôndrias inchadas e rompidas (Barbaro *et al.*, 1999). Uma vez que é prejudicial para a célula o acúmulo de mitocôndrias danificadas (Twig; Shirihai, 2011), o processo de mitofagia torna-se crucial para a sobrevivência das células infectadas pelo HCV (Kim *et al.*, 2014).

O pouco que se sabe a respeito das funções da NS5A na infecção do HCV, a inibição da apoptose é uma delas, tendo uma participação importante na sobrevivência celular (Cheng *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015; Siu *et al.*, 2016). Com base em nossos levantamentos bibliográficos, é possível que a NS5A favoreça a sobrevivência de hepatócitos infectados pelo HCV não apenas ao atuar na reciclagem de mitocôndrias danificadas, mas também na ativação da via glicolítica.

O influxo desregulado de cálcio do retículo endoplasmático para as mitocôndrias e o aumento significativo de ROS, provocados pela NS5A, compromete a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e da fosforilação

oxidativa (OxPhos), porém, as células infectadas pelo HCV não mostram sinais evidentes de sofrimento ou falha bioenergética (Scrima *et al.*, 2018). Um fator importante e regulador do metabolismo de células, que se encontram sob condições de estresse, é o fator 1α induzível por hipóxia (HIF- 1α) (Wang; Semenza, 1993).

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico composto por uma subunidade HIF- 1α , sensível ao oxigênio, e HIF- 1β , que encontra-se no núcleo. A HIF- 1α é continuamente degradada sob tensão normal de oxigênio, sofrendo hidroxilação pelas prolinas hidroxilases (PDHs) dependentes de oxigênio (Bruick; McKnight, 2001). O HIF- 1α hidroxilado é então ubiquitinado e direcionado para a degradação proteossomal (Mole *et al.*, 2001).

Contudo, sob condições hipóxicas, a hidroxilação do HIF- 1α é interrompida e o fator de transcrição se acumula e se move para o núcleo, ligando-se ao HIF- 1β , formando um heterodímero, onde promove a transcrição de vários genes anti-apoptóticos, além dos genes que codificam enzimas glicolíticas (Semenza *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). Curiosamente, além das condições de hipóxia, o aumento de radicais livres e do influxo de cálcio mitocondrial também inibem a atividade da PHD, resultando na estabilização do HIF- 1α (Déry *et al.*, 2005; Pugh, 2016).

Frente a estabilização do HIF- 1α , os genes que codificam as enzimas glicolíticas, hexoquinase I e II (HKI, HKII), são transcritos. Além de participar da via glicolítica, a HKI interage com a membrana mitocondrial externa, bloqueando assim os sinais apoptóticos (Abu-Hamad *et al.*, 2008; Schindler; Foley, 2013).

O fluxo glicolítico aumentado leva ao acúmulo de piruvato, que também inibe a PHD, auxiliando na manutenção do funcionamento da via glicolítica (Scrima *et al.*, 2018). O piruvato entra na mitocôndria onde é convertido em acetil-CoA (AcCoA) pela piruvato desidrogenase (PDH), esta enzima está sujeita a ação da piruvato desidrogenase fosfato (PDP), o qual é ativada pela carga de cálcio mediada pela NS5A presente na mitocôndria (Roche *et al.*, 2001).

O aumento de AcCoA leva à formação de citrato (CIT), que não é mais transformado através do ciclo tricarboxílico, pois, devido a atividade da cadeia transportadora de elétrons prejudicada, há baixa disponibilidade de NAD^+ . O citrato, então, sai da mitocôndria, sendo transportado para o citosol (Roche *et al.*, 2001). O AcCoA citosólico sob a ação da acetil-CoA carboxilase (ACC)

funciona como precursor para a síntese *de novo* de ácidos graxos (AG), que com intermediários da glicólise formam triglicerídeos que se acumulam como gotículas lipídicas (Wakil *et al.*, 1983; Kim, 1997).

Estudos mostram que as células Huh-7.5, transfectadas com o replicon do HCV, exibem uma expressão duas vezes maior de acetil CoA carboxilase (ACC) (Shi *et al.*, 2016). A atividade de ACC é controlada pela fosforilação inativadora através da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que por sua vez é controlada pelo estado fosforilado da serina-treonina quinase (Akt/proteína quinase B). A fosforilação de Akt é mediada pela ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Hardie, 1989).

Segundo os estudos de Street *et al.* (2005), a NS5A se liga e ativa a PI3K, resultando na ativação da Akt (Street *et al.*, 2005). Notavelmente, a Akt fosforilada é conhecido por inativar a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) que inibe a atividade da proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esterol do fator de transcrição (SREBP 1c) controlando a expressão de ACC (Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2009; Yecies *et al.*, 2011; Scrima *et al.*, 2018) (Figura 7).

A acetil CoA depende da descarboxilação oxidativa do piruvato, catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase (PDH). A função da PDH esta à mercê do seu estado de fosforilação, que por sua vez depende das atividades equilibradas de uma PDH quinase (PDK) e uma PDH fosfatase (PDP) (Roche *et al.*, 2001). Segundo os experimentos de Scrima *et al.* (2018), as células Huh 7.5, transfectadas com o replicon do HCV, exibiam níveis de transcrição aumentados de PDH e PDP.

NS5B é uma enzima 'error-prone', ou seja, ela incorpora nucleotídeos errados a uma taxa de 10^3 nucleotídeos por geração. Ao contrário das polimerases celulares, a proteína NS5B não possui um sistema de reparo que impeça a incorporação de ribonucleótidos incorretos. O conjunto destas propriedades enzimáticas somada à elevada taxa de replicação do HCV promove a criação de uma alta gama de quasispecies virais (Kupfer, 2016).

1.7 Variabilidade Genética do HCV

A RNA polimerase do HCV possui uma atividade de reparo deficiente, resultando em erros na sequência de nucleotídeos. Além disso, não há atividade de exonuclease 5' para 3' para corrigir esses erros. A soma destes dois fatores resulta em uma alta variabilidade genética do vírus HCV, a frequência média de mutações varia entre $1,4 \times 10^3$ a $1,9 \times 10^3$ substituições por ano (Steinhauer; Domingo; Holland, 1992).

As regiões correspondentes aos domínios envolvidos na tradução ou replicação e as extremidades 5' e 3' não codificantes são as mais conservadas. Sendo a região 5' não codificante a mais altamente conservada do genoma, apresentando mais de 90% de identidade, inclusive entre as sequências de cepas geneticamente mais distantes. A conservação destas regiões demonstram que são essenciais às funções virais (Beaumont, *et al.*, 2020). A região que codifica o capsídeo também é uma porção do genoma extremamente bem conservada, com aproximadamente 80% de identidade na sequência entre as diferentes cepas isoladas (Feinstone *et al.*, 1975).

Já as regiões mais variáveis do genoma são as que codificam as glicoproteínas do envelope (E1 e E2), em E2 há duas regiões hipervariáveis denominadas HVR1 e HVR2. Os polipeptídeos codificados nestas regiões são tolerantes a substituições de aminoácidos, o qual podem apresentar uma variação de até 50% entre diferentes cepas isoladas (Smith, 1999; Labonté, 2002).

As mutações em HVR-1 e HVR-2 fornecem ao vírus vantagens adaptativas, como: tropismo, virulência e resistência a drogas (Kato *et al.*, 1993; Cerny; Chisari, 1994). Além disso, as mutações em HVR-1 possui uma importância fundamental na capacidade do vírus em evitar as respostas do sistema imune do hospedeiro (Ray *et al.*, 1999).

Há uma alta taxa de mutações por ano descrita em casos agudos e crônicos em infecções por HCV (Higashi *et al.*, 2005). Sendo, provavelmente, as variações de sequência em HVR-1 um dos principais fatores no surgimento da grande variedade de quasispécies na fase aguda, cuja a persistência induz à infecção crônica (Roger, 2021).

1.8 Tratamento da hepatite C e seus desafios

Os diferentes genótipos influenciam diretamente na evolução e gravidade da doença. Pacientes infectados com o vírus HCV do genótipo 3, por exemplo, exibem rápida progressão à cirrose hepática e maior risco de desenvolver esteatose hepática e carcinoma hepatocelular (Bechmann *et al.*, 2012; Lonardo, 2014; Nirei *et al.*, 2017). Enquanto que a resistência à insulina possui maior prevalência em pacientes infectados com os genótipos 1 e 4 (Moucari *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2012). Os genótipos também exercem uma influência importante quanto à responsividade ao tratamento (Roger, 2021).

Os primeiros fármacos utilizados para tratamento da hepatite C eram a base de interferon administrados conjuntamente com ribavirina. Porém, a variabilidade genética dificulta a terapia da doença, pois os genótipos respondem de formas diferentes aos tratamentos antivirais, como os genótipos 1 e 4 que são mais resistentes a terapias baseadas em interferon do que os genótipos 2 e 3 por exemplo (Chayama; Hayes, 2011; Chevaliez; Pawlotsky, 2007; El-Shamy; Hotta, 2014).

Como mencionado no item 1.6.8, a NS5A tem um papel crucial na resistência ao interferon, já foi constatado que pacientes infectados pelo HCV-1b com mutações na região ISDR apresentam uma resposta à terapia com interferon muito aquém do esperado (Shen *et al.*, 2007; Mcphee, *et al.*, 2015).

Inchauspe *et al.*, 1991, identificou na região C-terminal da NS5A outro domínio, com 27 aminoácidos e alto nível de variabilidade, denominado V3 (Inchauspe *et al.*, 1991). Segundo Duverlie *et al.* (1998), há relação entre o nível de mutação em V3 e a resposta à terapia com interferon (Duverlie *et al.*, 1998). Essa correlação foi confirmada ao estudar a diversidade de quasispécies do HCV sob tratamento combinado de interferon-ribavirina em todo o gene NS5A e nas regiões de interesse, ISDR e V3. Tais estudos demonstraram que o domínio V3 apresentou maior diversidade genética em pacientes com infecções resistentes

ao tratamento a base de interferon (Veillon *et al.*, 2004; Puig-Basagoiti *et al.*, 2005; Le Guillou-Guillemette, 2007).

Sendo assim, era necessário fazer a genotipagem do vírus antes de determinar o tratamento (Roger *et al.*, 2021). Contudo, por se tratar de um vírus de RNA com altas taxas de replicação e mutação, não é improvável que quase todas as mutações possíveis existam ao mesmo tempo, de forma que um grande número de quasispécies possam estar presentes em um mesmo paciente (Martell *et al.*, 1992).

Dessa forma, novas abordagens de tratamento foram necessárias, sendo desenvolvidos os agentes antivirais de ação direta (DAAs) das classes buvir (tendo como principal representante o Sofosbuvir), asvir (como principal representante o Daclatasvir) e previr (como principal representante o Simeprevir) (Hayes; Imamura; Chayama, 2019).

Inicialmente, os DAAs foram utilizados concomitantemente com interferon e ribavirina, aumentando simultaneamente tanto as taxas de resposta, quanto a dos efeitos adversos (Hayes; Imamura; Chayama, 2019).

Em 2011 o Japão foi o primeiro a aprovar um tratamento administrando DAAs de forma combinada sem interferon ou ribavirina (Poole, 2014). Trata-se de uma terapia totalmente oral, na qual o asunaprevir, um inibidor de protease melhorado, combinado com o daclatasvir, um inibidor da NS5A, administrados em diferentes estágios do ciclo viral, tem se mostrado altamente efetivo, o que aumenta a segurança e tolerabilidade ao tratamento (Feld *et al.*, 2015; Götte; Feld, 2016; Kumthip; Maneekarn, 2015).

Nos Estados Unidos, onde predomina o genótipo 1a, o tratamento baseia-se no sofosbuvir, inibidor da polimerase NS5B, este tem assumido o protagonismo no tratamento do HCV (Herbst; Reddy, 2013). A terapia mais utilizada na Ásia é a combinação de asunaprevir e daclatasvir, sendo extremamente eficaz contra o genótipo 1b, a forma mais comum no Japão (Kanda *et al.*, 2016).

Contudo, a administração do asunaprevir e daclatasvir vem provocando a geração de variantes associadas à resistência (RAVs), relacionadas a fosfoproteína NS5A (Murakami, 2014). A presença de RAVs aumentam a resistência ao tratamento, gerando uma pressão seletiva em relação as variantes associadas à NS3.

Embora o tratamento ainda seja eficiente na maioria dos casos, existe uma parcela de pacientes que não conseguem eliminar o vírus e estão acumulando RAVs, que agem, inclusive, na eficácia de tratamentos mais recentes com perfis de resistência semelhantes (Hayes; Imamura; Chayama, 2019). A solução tem sido a terapia com sofosbuvir, que até o momento tem se apresentado como uma eficiente barreira contra o surgimento de RAVs (Gane *et al.*, 2017).

Além de não apresentar resistência, o sofosbuvir também se enquadra como um medicamento pangenotípico ao ser associado a novos medicamentos como velpatasvir e voxilaprevir. Outros medicamentos desta natureza são oglecaprevir associado ao pibrentasvir. Fármacos pangenotípicos geraram um avanço no tratamento da hepatite C, não apenas por abrangerem todos os diferentes genótipos do vírus, mas por eliminarem a etapa de genotipagem no pré-tratamento, agilizando a administração do medicamento e, consequentemente, contribuindo para a eficácia do tratamento (Freha *et al.*, 2022).

No Brasil, o Ministério da Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) sugere por meio do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C que a partir de 2022 iniciou-se um período de transição para que as Unidades Federativas finalizem seus estoques de medicamentos não pangenotípicos, após este período os centros de saúde passarão a ofertar apenas terapêuticas pangenotípicas para pacientes adultos e pediátricos com 12 anos ou mais, ou pesando pelo menos 30 kg. Estas medidas garantiram terapias seguras e eficazes à população, além de promover à simplificação do teste diagnóstico ao dispensar genotipagem do vírus para definição do tratamento, exceto em crianças de 3 a 11 anos ou com menos de 30 kg. As combinações e doses destes medicamentos são definidas de acordo com o quadro clínico de cada paciente (Brasil Ministério da Saúde, 2023).

É importante salientar que as terapêuticas disponíveis no mercado visam a negatificação da carga viral (RNA-HCV) no sangue periférico. Contudo, o HCV está diretamente associado a alterações inflamatórias crônicas no fígado, lesionando o tecido e afetando a função hepática (Jee *et al.*, 2016; Sebastiani; Gkouvatsos; Pantopoulos, 2014). Em outras palavras, no estadiamento crônico da doença a carga viral torna-se irrelevante, pois a iniciação de cascatas inflamatórias culmina em diversas desordens metabólicas, resultando em

quadros clínicos mais graves, tais como o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC).

A inflamação crônica também conduz a distúrbios extra-hepáticos, como glomerulonefrite, distúrbios da tireoide, diabetes tipo 2, porfiria cutânea tardia, crioglobulinemia mista, linfoma não Hodgkin de células B, aterosclerose, síndrome de Sjögren e doenças cardiovasculares (Moriishi; Matsuura, 2012; Taherkhani; Farshadpour, 2017; Zampino *et al.*, 2013). Dessa forma, com o intuito de aperfeiçoar o tratamento, outras monoterapias ou combinações terapêuticas têm sido exploradas (Noorali; Pace; Bagasra, 2011).

Contrapondo aos medicamentos alopáticos com suas ações direcionadas aos mecanismos de replicação viral, mas nenhum efeito sobre o processo inflamatório, os compostos naturais bioativos (CNBs) se emergem como uma importante ferramenta terapêutica coadjuvante para pacientes que se encontram em diferentes estágios de cronicidade. Muitos desses compostos têm demonstrado grande potencial terapêutico coadjuvante para várias doenças, com ampla diversidade química, baixo custo e efeitos colaterais mais brandos ou inexistentes (Jardim *et al.*, 2015).

Dentre a gama de CNBs atualmente estudada, destacamos dois deles: a curcumina e a piperina, alvos de várias pesquisas clínicas e laboratoriais, com a finalidade de investigar seus efeitos analgésicos, hepatoprotetores, anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos, antiparasitários, e no controle da asma, diabetes, dermatite e Alzheimer (Assis *et al.*, 2017; Konduru; Lee; Li, 2016; Nabavi *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2017).

A curcumina tem mostrado possuir efeito inibitório sobre diversos microrganismos, sendo capaz de inibir a sinalização celular em diferentes etapas, em alguns casos atuando diretamente sobre a maquinaria de replicação viral, reduzindo atividades enzimáticas e até mesmo degradando proteínas específicas (Rechtman *et al.*, 2010). Estudos com HCV *in vitro* sob efeito da curcumina, desenvolvidos por Chen *et al.* 2012, observaram que o composto possui atividade tóxica sobre a replicação viral, enquanto Anggakusuma *et al.* 2014, mostraram que a curcumina apresentou atividade inibitória significativa sobre a entrada do vírus no hepatócito.

A piperina apresenta diversas atividades biológicas importantes, como ação antioxidante, antiinflamatória, antidepressiva, antimutagênica, antipirética,

antitumoral e antiproliferativa (Lai *et al.*, 2012; Tawani *et al.*, 2016). Ademais, a piperina tem demonstrado a propriedade de aumentar a biodisponibilidade de outros fitoquímicos e fármacos (Tawani *et al.*, 2016; Atal *et al.*, 2016). Em nosso laboratório, o trabalho de tese da doutoranda Rute Lopes (2019), Processo Fapesp 2017/004500-9, em estudo *in vitro*, possibilitou estabelecer que a curcumina associada à piperina apresentou resultados expressivos sobre o controle da produção e liberação da lipopartícula associada ao HCV (VLDL-HCV); induzindo a apoptose em células infectadas (aumento da relação Bax/Bcl-2 e redução de c- Caspase-3) e aumento da fosforilação de Akt1 (p-Akt1) indicando possivelmente uma maior regulação de vias de sinalização intracitoplasmáticas dependentes de AMPK, principalmente a lipogênese, a qual apresenta uma relação direta com a formação de gotas lipídicas, essencial para a produção das lipopartículas virais. Nesse aspecto, é possível que o controle de vias metabólicas específicas, associadas ou não com proteínas do HCV, pelos CNBs, possam contribuir para o controle do processo inflamatório crônico e suas comorbidades presentes nos portadores da hepatite C crônica.

A natureza das vias metabólicas relacionadas à fosfoproteína NS5A do HCV as tornam excelentes alvos em potencial para a ação da curcumina e piperina. Estes CNBs, sendo excelentes antioxidantes, podem agir sobre várias vias metabólicas distintas da NS5A, que está intimamente envolvida no processo de estresse oxidativo, influenciando a ativação da via glicolítica mediada pelo HIF-1 α , além de atuar no processo de mitofagia ao interagir com um marcador autofágico crucial, a p62. É provável que a ação da NS5A sobre ambas as vias faça com que o vírus impeça a célula de iniciar o processo de apoptose, garantindo a integridade celular, o que consequentemente fornece as condições necessárias para o sucesso da replicação viral (Irshad *et al.*, 2017).

A NS5A também está relacionada ao processo de montagem da lipopartícula viral ao interagir com a proteína VAP-A (Qiao; Lou, 2019). É possível que, caso estes CNBs atuem sobre a NS5A, seja observado uma diminuição da expressão da p62 e VAP-A.

Outro ponto a se ressaltar, é a ação inibitória da curcumina sobre o NF- κ B (Tong *et al.*, 2016, Zhou *et al.*, 2016), fator que possui um papel fundamental na absorção do colesterol via HSPG-SMAD6-SMAD7, no processo de infecção do HCV (Jassey *et al.*, 2019).

Dessa forma, o estudo da relação entre a atividade de CNBs com o vírus HCV, em suas diversas etapas extra e intracelular se justifica como uma necessidade de avaliar os efeitos desses compostos nos mecanismos e vias moleculares relacionadas ao ciclo replicativo do vírus, bem como na modulação do processo inflamatório à medida que a doença progride. É importante ressaltar que não descartamos uma ação direta dos CNBs sobre a atividade da NS5A. Contudo, o foco do trabalho proposto não está propriamente nas enzimas que são alvos do processo replicativo do vírus HCV, mas nas vias que são utilizadas ou bloqueadas pelo vírus para garantir a sua perpetuação; e, concomitantemente buscar diminuir ou até mesmo cessar o processo inflamatório crônico.

Afim de melhorar a biodisponibilidade, conseqüentemente, a resposta do tratamento com CNBs, os compostos em questão foram nanoemulsionados. Os sistemas de liberação de fármacos em nanoemulsão são eficazes na solubilização de componentes alimentares bioativos hidrofóbicos e drogas lipofílicas (Gutiérrez *et al.*, 2008), por via oral, parenteral, ocular e tópica (Hu *et al.*, 2004; McClements *et al.*, 2007; Oca-Ávalos *et al.*, 2017; Sanguansri *et al.*, 2005 ; Weiss *et al.*, 2008; Komaiko; McClements, 2016).

Além disso, ao nanoemulsionar os CNBs há uma melhora na estabilidade físico-química dos compostos bioativos, melhorando a bioatividade dos componentes nanoemulsionados (Karthik *et al.*, 2017). Assim, os sistemas de liberação de fármacos em nanoemulsão são métodos promissores para a formulação de fármacos (Kumar *et al.*, 2019), sendo um ótimo sistema a ser testado no contexto deste trabalho.

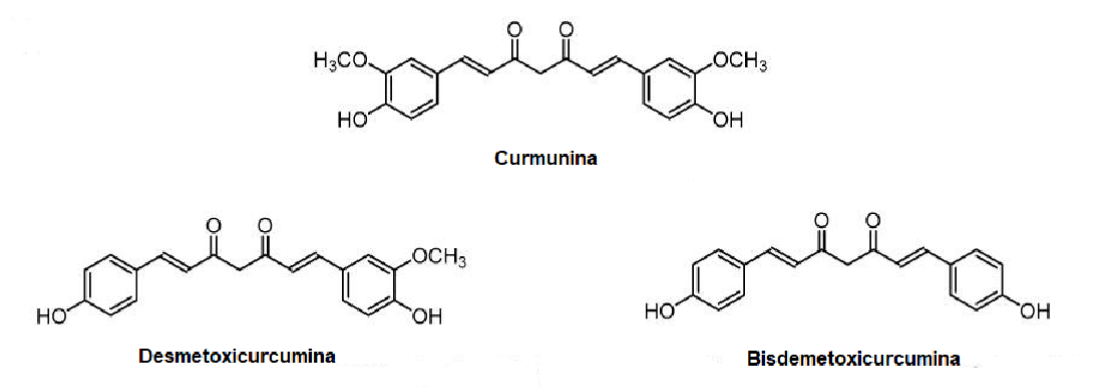
1.9 Propriedades da Curcumina

A curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) é um polifenol lipofílico proveniente da cúrcuma, um rizoma da *Curcuma longa*, uma planta relacionada à família do gengibre (Zingiberaceae). Originária da Índia, é uma especiaria comum usada na preparação de curries (Kotha; Luthria, 2019).

Há três polifenólicos bioativos, também chamados de curcuminoides, identificados na cúrcuma (Figura 8): a curcumina (CUR), a mais abundante, representando 77% destes curcuminoides, em seguida a desmetoxicurcumina (DMC) com 17 % e por fim, de 3 a 6% são de bisdesmetoxicurcumina (BMC). A

Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, consideraram os curcuminoides seguros, sendo permitido uma alta dose oral única de até 12 g/dia de curcuminoides (Prasad *et al.*, 2014; Gupta; Patchva; Aggarwal, 2013; Kotha; Luthria, 2019).

Figura 8: Estrutura química dos curcuminoides



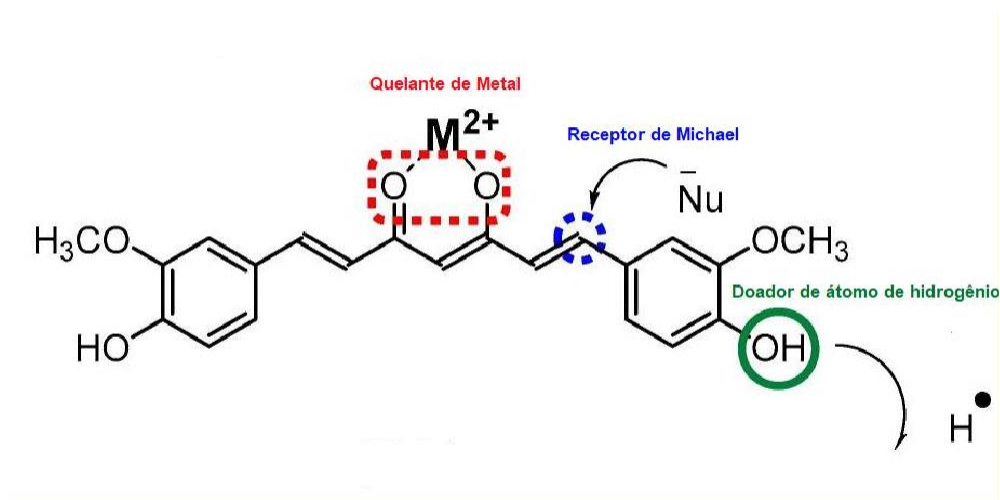
Fonte: Kotha; Luthria, 2019.

A curcuma é composta por basicamente 70% de carboidratos, 13% de umidade, 6% de óleos essenciais (felandreno, cineol, sabineno, borneol, zingibereno e sesquiterpenos), 6% de proteína, 5% de gordura, 3% de minerais (cálcio, potássio, fósforo, ferro e sódio), 3 a 5% de curcuminoides e vestígios de vitaminas (niacina, B1, B2 e C) (Nelson *et al.*, 2017).

Como já mencionado a curcuminina possui alto potencial anti-inflamatório, antidiabético, anticancerígeno e antienvhecimento, demonstrado em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, o potencial terapêutico da curcuminina é limitado devido a sua baixa solubilidade em meios aquosos e baixa biodisponibilidade, o que têm gerado diversos estudos afim de potencializar a absorção e ação deste composto, como o desenvolvimento de nanopartículas, lipídios e polímeros (Kotha; Luthria, 2019).

Na curcuminina destacam-se três sítios reativos, conforme ilustrado na Figura 9, responsáveis pelo potencial terapêutico do composto, sendo: um doador de átomo de hidrogênio, o receptor de Michael e um quelante de metal. A capacidade quelante de metal da curcuminina tem se mostrado vital quanto a ação terapêutica contra doenças como Alzheimer, câncer, depressão e artrite (Nelson *et al.*, 2017; Kotha; Luthria, 2019).

Figura 9: Sítios de reatividade química na curcumina



Fonte: Kotha; Luthria, 2019.

1.10 Propriedades da Piperina

A piperina é um dos principais alcaloides naturais derivada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L.), um membro da família Piperaceae, também é encontrada nos frutos maduros de *Piper longum* L. e nas raízes de *Piper sarmentosum* Roxb (Han *et al.*, 2023).

A molécula de piperina, Figura 10, contém um anel dioximetileno, um grupo amida e uma cadeia olefínica alifática. Como já mencionado, a piperina possui muitas atividades biológicas, incluindo propriedades anticancerígenas, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antimaláricas, além de combater o Alzheimer e a doença de Parkinson. A estrutura da piperina apresenta características que permitem modificações em múltiplos sítios de modo a obter derivados com maior potencial terapêutico, que são amplamente utilizados não apenas na área da saúde mas também no campo agrícola como no desenvolvimento de inseticidas (Han *et al.*, 2023; Benayad *et al.*, 2023).

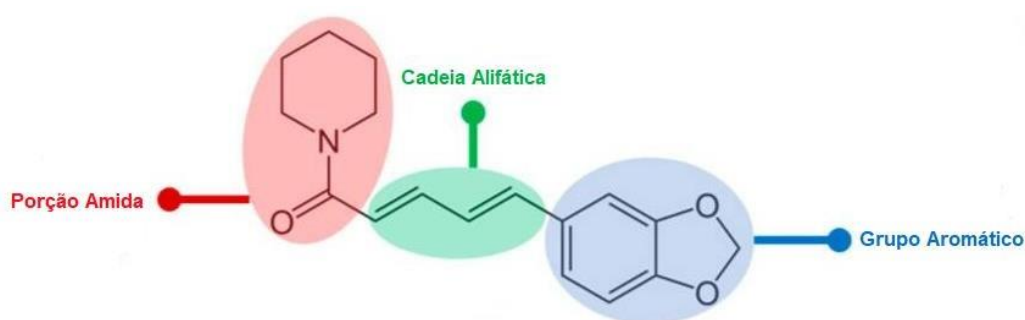
A piperina foi selecionada neste trabalho sobretudo pela sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade da curcumina. Há vários fatores que determinam a biodisponibilidade de um medicamento, isto inclui como o medicamento é liberado, se é estável no trato gastrointestinal, se é facilmente dissolvido, a velocidade em que passa pela parede intestinal e se sofre

metabolismo pré-sistêmico (Burton *et al.*, 2002; Benayad *et al.*, 2023). A piperina foi considerada o primeiro intensificador de biodisponibilidade, validado cientificamente (Benayad *et al.*, 2023).

O aumento da biodisponibilidade provocado pela piperina pode ocorrer através de vários mecanismos. A piperina pode atuar em proteínas transportadoras como proteínas transmembranas ABC, expressas abundantemente na camada epitelial da parede intestinal, responsáveis pelo efluxo de medicamentos. Estudos também demonstraram que a piperina inibe a P-gp e o citocromo p450. Além disso, também foi descoberto que a piperina aumenta a biodisponibilidade de vários agentes naturais, como o resveratrol e a curcumina, ao inibir a glucuronidação, aumentando significativamente a concentração plasmática destes compostos. Em outras palavras, a piperina evita que a curcumina seja rapidamente degradada pelo fígado e consequentemente secretada pelos rins (Atal; Bedi, 2010; Ziegenhagen *et al.*, 2021).

A natureza pleiotrópica e eficaz deste composto explica o fato do aumento de estudos sobre a piperina, inclusive no desenvolvimento de seus derivados, que contribuem com a ampliação deste leque de possibilidades na forma em que poderão ser utilizados em diversas áreas (Han *et al.*, 2023; Benayad *et al.*, 2023).

Figura 10: Estrutura química da piperina



Fonte: Benayad *et al.*, 2023.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os compostos curcumina e piperina, sem e em nanoemulsões, sobre mecanismos e vias moleculares, concernentes a fosfoproteína NS5A afim de determinar a influência de tais vias na replicação e montagem viral, além do processo de inibição da apoptose e manutenção da sobrevivência em hepatócitos Huh-7.5, expressando ou não o replicon subgenômico do HCV, SRG-JFH1.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar o sistema de nanoemulsão para o carreamento da curcumina e piperina.
- Avaliar o potencial de internalização da nanoemulsão nas células Huh 7.5 por análise de citometria de fluxo e confocal.
- Avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade nas linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.
- Analisar os níveis de NS5A, HIF-1 α e p62 relacionados ao processo de sobrevivência das células infectadas por *western blotting*.
- Mensurar os níveis de carga viral da linhagem SGR por *qPCR*.
- Avaliar os níveis de apoptose de células Huh 7.5 e Huh 7.5-SGR tratados com CNBs sem e com o sistema de nanoemulsão.
- Mensurar os níveis de expressão de SMAD 6, SMAD 7 e VAP-A por *qPCR* e correlacionar com a carga viral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As células Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o replicon subgenômico SGR- JFH1 (Japanese fulminant hepatitis-1, genótipo 2a) estão sendo mantidas em cultura no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular em sua área de biossegurança nível 3, localizado no Departamento de Análises Clínicas, supervisionado pelo Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa da FCFAR- UNESP/Araraquara, 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).

3.1 Compostos Naturais Bioativos em nanoemulsões

Nanoemulsão é uma dispersão coloidal de dois líquidos imiscíveis, termodinamicamente instável, o qual um dos líquidos forma a fase dispersa e o outro líquido forma o meio dispersante (McClements, 2012). A nanoemulsão apresenta gotículas, com diâmetros que podem variar entre 10 a 200 nm, revestidas de moléculas emulsificantes (Cerpňjak *et al.*, 2013; Gibaud; Attivi, 2012; Rehman *et al.*, 2021).

O sistema de nanoemulsão é composto por óleos, lipídios, surfactantes e água. Na formulação de nanoemulsões, a fase oleosa pode incluir triglicerídeos como tri, di ou monoacilgliceróis, óleos vegetais, óleos minerais, ácidos graxos livres, entre outros (Gonçalves *et al.*, 2018).

A seleção do óleo é geralmente baseada na solubilidade do fármaco (Qadir *et al.*, 2016). Os tensoativos utilizados nos sistemas de nanoemulsão para administração de drogas e ingredientes alimentícios são: spans (ésteres de ácidos graxos de sorbitano), tweens [derivados de polioxietileno (POE) do éster de ácido graxo de sorbitano], Cremophor® EL (óleo de rícino polioxil-35), lauroil macro- glicerídeos (Gelucire®44/14), polissacarídeos (derivados de goma e amido), fosfolipídios (ovo, soja ou lecitina láctea) e proteínas anfífilas (isolado de proteína de soro de leite e caseinato) (Komaiko; McClements, 2016; Singh *et al.*, 2017).

Os compostos naturais bioativos (CNBs) analisados serão: curcumina (CL, C1386) e piperina 97% (PP, P49007), ambos adquiridos da Sigma Aldrich. As

nanoemulsões foram desenvolvidas em colaboração com o laboratório do professor Dr. Marlus Chorilli, utilizando a metodologia baseada nos trabalhos de Bouchemal *et al.* com modificações (Bouchemal *et al.*, 2004). A fase oleosa composta de fosfatidilcolina de soja (0,4% p/v) e triglicérides de cadeia média (1,8% p/v) foram pesadas juntamente com os fármacos na concentração de 2000 uM. A fase aquosa composta por polissorbato 80 (2,1% p/v) e água q.s.p. 5 g foi adicionada gota a gota sobre a fase oleosa, formando então uma pré-emulsão. Esta foi sonicada com 5 ciclos de 1 minuto, com pulse on de 1 min e pulse off de 30 s, amplitude 27.

Foram feitos ensaios de caracterização de acordo com o tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta. O diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta das gotículas serão analisados utilizando método de espalhamento de luz dinâmica (DLS - Dynamic Light Scattering) usando o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Será calculado o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstein (equação 1):

Equação 1:

$$D = KT / 6\pi\eta R_h$$

Sendo que: D é o coeficiente de difusão das partículas; K a constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23}$ NmK); T a temperatura absoluta (293,15 K); π é 3,141592; η a viscosidade ($1,002 \times 10^{-3}$ NM-2s) e R_h é o raio hidrodinâmico.

As formulações foram aferidas na célula eletroforética, permitindo que feixe de laser atravessasse a dispersão completamente. O sistema foi mantido a uma temperatura de 25°C, o comprimento de onda do laser foi estabelecido em 532 nm e o índice de refração foi determinado de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram estabelecidas três determinações do diâmetro hidrodinâmico médio e do IPD das gotículas. O PZ foi feito para determinar a mobilidade eletroforética. Para cada amostra, foram realizadas três determinações do potencial de superfície, calculando a média e o desvio padrão. As análises foram realizadas com o uso do equipamento Zetasizer 3000HS. Por fim, foi selecionada a melhor nanoemulsão a ser testada com os CNBs. Os ensaios dos efeitos dos CNBs serão divididos em três tratamentos: CL/PP sem a nanoemulsão (CL/PP), CL/PP em nanoemulsão

(CL/PP nano) e apenas a nanoemulsão (nano branca). A proporção de CL/PP tanto livre quanto nanoemulsionado foram de 20:1, sendo considerado a proporção mais eficaz de acordo com o trabalho de doutorado de Rute Lopes (2019), Processo Fapesp 2017/004500-9.

3.2 Cultura Celular

As células Huh-7.5 estão sendo cultivadas em meio de cultura DMEM – Sigma D1152 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com soro bovino fetal, solução de aminoácidos não essenciais (Sigma M7145), penicilina e estreptomicina. Já as células SGR- JFH1, contendo o replicon subgenômico do HCV genótipo 2a, clonado no vetor que expressa o gene de resistência à neomicina estão sendo cultivadas em meio DMEM completo contendo como antibiótico seletivo a geneticina (G418, Gibco, código 11811031). As células estão sendo mantidas em estufas de CO₂ a 37°C. Para a realização dos experimentos será utilizada tripsina-EDTA 0,25% (Sigma T4049), em solução salina de Hanks. A contagem será feita por coloração com azul de Trypan 0,2% (m/v) em PBS, no Countess II FL Automated Cell Count (Thermo Fischer Scientific).

3.3 Viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A análise de viabilidade das células foi feita afim de determinar a concentração em que as diferentes preparações de CL/PP apresentam citotoxicidade, bem como calcular a concentração inibitória média (IC₅₀). A análise foi realizada por ensaio colorimétrico de MTT seguindo a metodologia descrita na literatura (Twentyman; Luscombe, 1987) com modificações padronizadas no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular –FCFAR, UNESP, Araraquara.

O ensaio fundamenta-se na atividade de desidrogenases mitocondriais de células viáveis que reduzem metabolicamente o sal de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-dofeniltetrazólio (sal de MTT, de coloração amarela e solúvel em água), em cristais de formazan (cor azul-púrpura e insolúvel em

água). Assim, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após as 24 horas as células foram expostas às nanoemulsões de curcumina e piperina (20:1) sob concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 μM por 24 horas. Ao final desse período as células foram incubadas com a solução de MTT (1 mg/mL em DEMEM) por 4 horas. Após esse período foi adicionado isopropanol.

As amostras foram submetidas à leitura de absorbância realizada em espectrofotômetro de microplaca a 570 nm. Para o controle positivo (CP) de morte celular foi adicionado peróxido de hidrogênio, o branco foi constituído apenas por DMEM e o controle negativo (CN), representando 100% de viabilidade celular (VC), por células incubadas apenas com meio de cultura completo. Os ensaios foram feitos em sextuplicata e a média aritmética da absorbância do branco foi subtraída das médias dos tratamentos com CNBs e dos controles. Os valores foram calculados conforme a equação abaixo.

$$\text{CV (\%)} = \frac{([\text{CNBs}] - \overline{\text{Branco}})}{\text{CN}} \times 100$$

3.4 Ensaio de retenção do corante vermelho neutro

Foi realizado um segundo teste de citotoxicidade complementar, com o intuito de confirmar os resultados obtidos pelo teste de MTT. Este ensaio baseia-se na aplicação do corante vermelho neutro (2 – amino – 3 – metil – 7 – dimetil – amino - cloreto de fenazina), o qual penetra na membrana celular de células viáveis por difusão passiva, concentrando-se nos lisossomos.

O ensaio de retenção do vermelho neutro, assim como o MTT, é um teste colorimétrico. A absorbância obtida, através da leitura em espectrofotômetro, é diretamente proporcional à capacidade de retenção do corante pelos lisossomos, o que possibilita a determinação da toxicidade (Repetto; Del Peso; Zurita, 2008; Babich; Borenfreund, 1990).

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de Repetto; Peso; Zurita (2008), com algumas modificações. As células foram semeadas em placas de 96 poços a densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas por 24 horas em

estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após as 24 horas as células foram expostas às nanoemulsões de curcumina e piperina (20:1) sob concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µM por 24 horas. Para o controle positivo (CP) de morte celular foi adicionado peróxido de hidrogênio (1mmol L⁻¹) e o controle negativo (CN), representando 100% de viabilidade celular (VC), por células incubadas apenas com meio de cultura.

Ao final desse período as células foram incubadas com a solução de vermelho neutro (0,05 mg/mL em DEMEM) por 3 horas para permitir a captação da solução pelos lisossomos em células viáveis. Após esse período foi adicionado etanol 50% em água mili Q e ácido acético glacial (10:1). Os ensaios foram feitos em sextuplicata e a absorbância de cada amostra foi determinada em um leitor de microplaca a 570 nm.

3.5 Teste de Internalização por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que avalia populações celulares em suspensão, uma análise célula a célula em poucos segundos, sendo possível detectar simultaneamente vários parâmetros bioquímicos (Givan, 2004). No processo de internalização celular de nanopartículas, esta técnica é cada vez mais utilizada para avaliar, quantitativamente, a eficiência de absorção de sistemas de carreamento pela célula (Ibuki; Toyooka, 2012).

Para o teste de internalização por citometria de fluxo foi utilizado o protocolo de Fernandes *et al.*, (2021), a nanoemulsão foi marcada com 1µM de DIO (Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina, Sigma D4292), um marcador lipofílico fluorescente, cedido gentilmente pelo professor Marlus Chorilli. O DIO foi incorporado pela nanoemulsão através do mesmo método utilizado para nanoemulsionar a CL/PP descrito no item 3.1.

A nanoemulsão marcada foi diluída em meio DEMEM, coletando o mesmo volume utilizado para diluir a nanoemulsão de CL/PP a 15 µM, para garantir a mesma quantidade de gotículas presentes na concentração teste dos compostos naturais.

As células foram cultivadas a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ em placas de 12 poços, o qual foi adicionado 3mL da nanoemulsão marcada com DIO. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por 24 horas. Após findar o período de exposição, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas

e transferidas para um falcon de 15mL. As células foram centrifugadas a 500×g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 5 mL de PBS, sendo centrifugado novamente, repetindo o processo de lavagem 5 vezes. Após as lavagens, as células foram ressuspensionadas em 400 µL de PBS e transferidas para um tubo de 5 mL de fundo redondo para citometria, foi adicionado 2µL de PI (BD Pharmingen, código 556547) no momento da leitura, a fim de desconsiderar a porcentagem de internalização de células não viáveis.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6 Flow Cytometer, com captura de dados utilizando o programa CFlow Plus software. A leitura para DIO foi realizada no canal FL1 (530/15 nm) e para o PI no canal FL2 (585/20 nm).

3.6 Confocal

A análise de confocal foi feita para avaliar se o sistema de nanoemulsão está sendo internalizado, ou apenas permanecendo em contato com a membrana plasmática no meio extracelular.

Para este experimento foi utilizado o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) do laboratório multiusuário de microscopia confocal do Instituto de Física de São Carlos (IFCS-USP).

A nanoemulsão foi marcada com CL e diluída em meio D-MEM com a concentração teste de 15 µM. As células foram plaqueadas, em discos próprios para a análise de confocal, a uma densidade $1,0 \times 10^6$, sendo incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após um período de 24 horas as células foram expostas à solução de nanoemulsão marcada com CL e incubadas novamente, sob as mesmas condições anteriores, por 24 horas.

Em seguida, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS, após a lavagem foi adicionado 1 mL de PBS com duas gotas de NucBlue (Hoechst 33342, *Invitrogen*) e incubado por 15 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ segundo as instruções do fabricante, para a marcação do núcleo. Para determinarmos a delimitação da célula também foi cultivado células em discos apenas com D-MEM, estas células foram lavadas e marcadas com um marcador de tubulina (Tubulin Tracker™ Green/ regon Green™ 488 Taxol, bis-acetate, *Invitrogen*), após diluído a solução de tubulina para 1x, foi adicionada 1 mL aos discos, ou volume suficiente para cobrir completamente as células. Os discos

foram incubados por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, após este período as células foram lavadas três vezes com PBS, em seguida foi adicionado 1 mL de PBS com duas gotas de NucBlue, sendo incubadas por 15 minutos novamente com as mesmas condições anteriores.

Por fim, após os núcleos serem marcados, as células foram fixadas com 4% de formaldeído por 15 minutos, em seguida foram lavadas com PBS e armazenadas em geladeira até o momento da leitura.

As amostras foram excitadas por um laser de argônio em uma faixa de excitação de 458 nm para a visualização da fluorescência da CL (emissão em 465 – 500 nm), 488 nm para a excitação do marcador de tubulina (emissão em 500 – 540 nm) e excitação em 360 nm para a visualização do núcleo com NucBlue (emissão em 460 nm).

3.7 Análise qualitativa das proteínas NS5A, p62 e HIF-1 α por *Western Blotting*

O método por *Western Blotting* é utilizado para a imunodetecção de proteínas após sua separação por eletroforese em gel e transferência de um extrato proteico para uma membrana absorvente (Kurien; Scofield, 2006). Sendo assim, a tal técnica permite detectar, caracterizar e semi-quantificar múltiplas proteínas, inclusive aquelas que estão em baixas quantidades na amostra. O método foi utilizado para analisar as proteínas NS5A, Hif-1 α , p62 e NF κ - β , sendo a última proteína analisada como um teste complementar.

Para este ensaio, foi plaqueado 1,0 x10⁶ células em placas de 24 poços, após 24 horas a cultura foi tratada com a nanoemulsão branca e os CNBs sem e com nanoemulsão a 15 μ M, expostas por 24 horas.

Após o tempo de exposição as células foram lavadas e tripsinizadas, a tripsina foi retirada ao descartar o sobrenadante após a centrifugação a 300 g. As células foram lavadas com tampão PBS e em seguida foi adicionado 500 μ L de tampão RIPA [Tris 50 mmol L⁻¹ pH 8; dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% (m/v); NaCl 150 mmol L⁻¹; 100 μ mol L⁻¹ EDTA; triton X-100 0,1% (m/v); deoxicolato de sódio 0,05% (m/v)], juntamente com o inibidor de protease (PMSF a 1 mmol L⁻¹; leupeptina a 42 μ mol L⁻¹) e inibidores de fosfatases (pirofosfato de sódio 1 mmol L⁻¹; fluoreto de sódio 1 mmol L⁻¹; ortovanadato de sódio 1 mmol L⁻¹). O pellet foi retirado das placas e transferido para o eppendorf. Mantiveram-se

expostas à solução de lise sob agitação contínua e refrigeração a 4°C por 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. Foi feita a quantificação de proteínas totais através do Kit de ensaio de proteína Pierce™ BCA (Thermo Fisher 23225), segundo as instruções do fabricante. Após este período as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C até o momento do experimento.

As proteínas de cada amostra foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 10 a 12%, de acordo com as massas moleculares das proteínas alvos. Como marcador de massa molecular foi utilizado SeeBlue Plus2 (Invitrogen, LC5925).

Finalizada a corrida deu-se início a transferência semiseca das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose de 0,45µm, realizada no equipamento Multifhor II Eletrophoresis System (Pharmacy) a uma tensão de 0,8 mV.cm por 1 hora, utilizando papéis filtros embebidos em tampão de transferência para envolver a membrana e o gel. Em seguida, foi realizado o bloqueio da membrana com TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 137 mM; 0,1% Tween 20) com 1,5% de albumina por 2 horas sob agitação. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com a solução contendo o anticorpo policlonal anti-HCV-NS5a (Novus Biologicals – NBP3-13010), anti-Hif1-α (Novus Biologicals – NB100-105), anti-p62/SQSTM1[p Ser349] (Novus Biologicals – NBP3-13329) e anti-NFκ-β, todos anti-coelhos e policlonais com exceção do Hif 1-α e do NFκ-β, estes anti-camundongos e monoclonais. Após 24 horas de exposição foi feita a lavagem com solução de bloqueio e incubado o anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo peroxidase na proporção 1:8000 e 1:3000, respectivamente. Após 2 horas de incubação as membranas foram lavadas e dispostas em uma superfície de vidro e embebidas em luminol, preparado por volumes iguais dos reagentes do kit de substrato quimioluminescente Pierce ECL (Thermo Scientific, 32106), conforme a instrução do fabricante. Após 2 minutos em exposição as membranas foram secas em papel filtro, afim de retirar todo o reagente de revelação e lido em um fotodocumentador C-Digit Blot Scanner.

Para a revelação do GAPDH foi realizado o procedimento de *mild stripping*, o qual foi retirado do anticorpo com o objetivo de reutilização da membrana. Após a detecção de sinal no C-digit a membrana é submetida a 5 lavagens em TBS-T por 5 min. Em seguida, esta membrana foi novamente

bloqueada, incubada com os anticorpos anti-GAPDH, o qual foi revelada seguindo o mesmo método descrito anteriormente.

3.8 Quantificação da expressão da carga viral do HCV por qPCR

Para a quantificação da carga viral intra e extracelular da SGR-JFH1 foram analisados o pellet e sobrenadante da cultura de células sem e pós tratamento com os CNBs e assim analisar o ritmo de replicação do vírus. Para este ensaio, foi plaqueado $1,0 \times 10^6$ células em placas de 24 poços, após 24 horas a cultura foi tratada com a nanoemulsão branca e os CNBs sem e com nanoemulsão a 15 μ M, expostas por 24 horas.

Após o tempo de exposição o meio foi coletado e reservado enquanto as células foram lavadas e tripsinizadas, a tripsina foi retirada ao descartar o sobrenadante de lavagem após a centrifugação a 300 g. O pellet e o sobrenadante foram transferidos para placas de 96 poços. Para esta análise foi utilizado o kit da Abbot RealTime HCV (4J86-90), o qual acompanha um frasco do controle interno e 3 frascos referentes aos reagentes de amplificação. Primeiramente, foi adicionado 500 μ L do controle interno em um frasco de tampão *mLysis* da Abbot *mSample Preparation*. Após preparada a solução de lise, esta foi adicionada ao pellet e sobrenadante na placa de 96 poços juntamente com as micropartículas magnéticas para purificar os ácidos nucléicos, o qual foram eluidos em fosfato de sódio a 5mM em pH 7,8. A extração do RNA foi feita de forma automatizada, pelo extrator Unitractor Uniscience.

Após a extração foi preparada a solução mix do kit da Abbot RealTime HCV (4J86-90), o qual contém três frascos numerados de 1 a 3, o primeiro frasco contém o tampão enzimático com cloreto de magnésio (importante para a atividade enzimática). O frasco de número 2 contém DNTP, estes são os nucleotídeos (primers) que serão inseridos na sequência durante a reação, já incluso a sonda FAM. Por fim, o frasco número 3 contém a enzima termoestável rTth DNA polimerase. O mix foi preparado adicionando todo o conteúdo do frasco 1 e 2 no frasco 3, segundo as instruções do fabricante. Em seguida foi adicionado 25 μ L de amostra e 25 μ L do mix em placas de PCR de 96 poços, o qual foram alocadas ao termociclador Agilent, AriaMx Real Time PCR System. Também foram utilizados controles pertencentes ao kit da Abbot, sendo dois referentes a calibragem, dois controles positivos e um controle negativo, o qual garante o bom

funcionamento do kit, além de constatar a ausência de contaminantes ao longo de toda a corrida.

Na análise de *qPCR* ocorrem ciclos térmicos repetidos, alternando temperaturas de incubação, para que os produtos de amplificação dissociem em fitas simples em temperaturas mais altas, possibilitando o anelamento e extensão do primer ao baixar a temperatura.

A reação de amplificação consiste na conversão do RNA alvo em cDNA, pela atividade de transcriptase reversa da enzima termoestável *rTth* DNA polimerase recombinante proveniente da bactéria Gram negativa *Thermus thermophilus*, à uma temperatura de 50 °C, de acordo com o tamanho dos amplicons. Os primers reversos e o controle interno (CI) anelam aos seus respectivos alvos, e são estendidos durante um período prolongado de incubação.

Em seguida, à uma temperatura de 95 °C, inicia-se a etapa de desnaturação, que está acima do ponto de fusão do produto de cDNA-RNA de dupla fita, acompanhada pelo anelamento de um segundo primer à fita de cDNA, sua extensão em virtude da atividade da *rTth*, e então a síntese do produto de fita dupla de DNA.

Durante os ciclos de leitura na amplificação, ocorre a redução da temperatura a 60 °C, permitindo a detecção de fluorescência, a reação termina após 40 ciclos. As sondas dos primers e do CI consistem em oligonucleotídeos de DNA de fita simples, formados por uma sequência de sonda com uma molécula fluorescente (reporter) que é covalentemente ligada à extremidade 5' da sonda, e uma molécula supressora (quencher) na extremidade 3'. A falta da sequência alvo na amostra, reprime a fluorescência pelo quencher. Na presença da sequência alvo, ocorre a hibridização da sonda às sequências complementares, separando o fluoróforo-reporter do quencher, e, consequentemente, permite a emissão e detecção de fluorescência.

Para cada tratamento, o *Ct* dos genes alvos foi registrado e comparado com o *Ct* do gene de referência *GAPDH*. Os valores de *Ct* são necessários para calcular a expressão relativa de RNAm de cada gene de interesse em relação ao gene referência. Essa relação é chamada de Delta *Ct* (ΔCt).

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{genereferência}})$$

No intuito de analisar a variação de expressão entre os tratamentos foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), calculando o ΔCt da média dos controles com a fórmula a seguir:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{gene alvo}} - \Delta Ct_{\text{controle}})$$

3.9 Quantificação da expressão das I-SMADS, VAP-A por qPCR

A quantificação de RNA das I-SMADS e VAP-A foi realizada nas células Huh 7.5 e SGR-JFH1 sem e após tratamento com os CNBs ou controle de veículo, estimando o ritmo normal da expressão destes genes. Para este ensaio, foi plaqueado $1,0 \times 10^6$ células em placas de 24 poços, após 24 horas a cultura foi tratada com a nanoemulsão branca e os CNBs sem e com nanoemulsão a 15 μM , expostas por 24 horas.

Após o tempo de exposição as células foram lavadas e tripsinizadas, a tripsina foi retirada ao descartar o sobrenadante após a centrifugação a 300 g. O pellet foi transferido para placas de 96 poços em tampão de lise, guanidina a 6 M, e micropartículas magnéticas para purificar os ácidos nucleicos, o qual foram eluídos em fosfato de sódio a 5mM em pH 7,8. A extração do RNA foi feita de forma automatizada, pelo extrator Unitractor Uniscience.

Após a extração foi preparada a solução mix, contendo 50 μg de RNA, 1,2 μM de prime já com a sonda FAM, 1x da solução One Step (Sigma KCQS08), o qual contém a enzima tanto com a função de transcriptase reversa quanto de TAQ DNA polimerase, o tampão enzimático com cloreto de magnésio e DNTP, nucleotídeos que serão inseridos na sequência durante a reação.

Por fim, foi adicionado 5 μL do mix e 10 μL de água ultrapura em placas de PCR de 96 poços e alocadas ao termociclador Agilent, AriaMx Real Time PCR System. A reação de amplificação ocorreu seguindo os mesmos princípios já descritos no item 3.8.

3.10 Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo

O protocolo anexina V e iodeto de propídeo (PI) é comumente utilizado para determinar a apoptose, necrose ou viabilidade celular através das características de integridade e permeabilidade da membrana plasmática e mitocondrial. Durante o processo de apoptose a fosfatidilserina de membrana é exposta ao meio extracelular, dessa forma, a alta afinidade da anexina V a este fosfolípido nos permite identificar os estágios iniciais de apoptose.

Já o PI é um corante fluorescente, que se liga ao DNA de células mortas ou em estágios tardios de apoptose. O PI pode ser considerado um indicador de exclusão de viabilidade celular, usado para determinar a integridade da membrana plasmática, pois em células viáveis ou em estágios iniciais de apoptose a membrana celular não é permeável ao PI (Crowley; Marfell; Scott; Waterhouse, 2016; Rieger *et al.*, 2011). Utilizando anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (anexina V FITC) e PI concomitantemente, como corantes celulares, é possível determinar as populações de células viáveis, não coradas (anexina V-/PI-); células em estágio de apoptose precoce (anexina V+/PI-) e células necróticas ou mortas (anexina V+/PI+) (Crowley; Marfell; Scott; Boughaba *et al.*, 2016). Os ensaios de apoptose e necrose foram realizados seguindo a metodologia de Rieger e colaboradores (2011) com modificações.

As células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura D-MEM a $1,0 \times 10^6$ 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. Em seguida, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com a CL/PP, CL/PP nano e a nano branca, diluídos em meio de cultura, nas concentrações de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ baseado no IC_{50} obtidos pelo ensaio de MTT e vermelho neutro. As células do controle negativo (CN) foram expostas apenas ao meio de cultura, já para o controle positivo (CP) as células foram tratadas com H_2O_2 0,1 mmol L^{-1} , agindo com indutor de apoptose (Xiang *et al.*, 2016).

As células foram incubadas por 24 h seguindo as condições anteriores. Posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi coletado em tubo tipo eppendorf.

Os poços foram lavados com PBS, e em seguida as células foram removidas pela ação de tripsina-EDTA e adicionadas ao sobrenadante do respectivo tubo para inativar a tripsina. Os tubos foram centrifugados a 300 $\times g$

por 10 min. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado, seguidas de centrifugação. O pellet foi suspenso em 100 μ L de tampão de ligação diluído 1:10 em água ultrapura, do kit de detecção de apoptose anexina V FITC I (BD Pharmigen, código 556547) e transferido para tubo de 5 mL de fundo redondo para citometria.

Foram adicionados 1 μ L de anexina V a cada tubo, incubando por 15 min no escuro. O volume final foi ajustado para 350 μ L com tampão de ligação, e 2 μ L de iodeto de propídeo (PI) foram adicionados imediatamente antes da leitura.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6 Flow Cytometer, com captura de dados utilizando o programa CFlow Plus software. A leitura para anexina V-FITC foi realizada no canal FL1 (530/30 nm) e para o PI no canal FL2 (670 nm).

3.11 Análise Estatística

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram verificados empregando o programa Statistica 10 (StatSoft, Inc). A análise estatística e os gráficos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Resultados estatisticamente significativos são aqueles cujo p-valor foi inferior ou igual a 0,05. No ensaio de PCR em tempo real e apoptose e necrose a avaliação foi estatisticamente analisada aplicando one-way ANOVA. O pressuposto de normalidade de distribuição da variável dependente (absorbância corrigida) foi validado em relação aos diferentes tipos de tratamento utilizando o teste de Bonferroni ($p > 0,05$).

4. Resultados e discussão

4.1 Preparo das nanoemulsões

Os compostos CL e PP foram preparados separadamente em nanoemulsões como descrito no item 3.1, em seguida foi feita a caracterização dessas moléculas pela técnica de DLS. O DLS é uma técnica comumente utilizada com o objetivo de mensurar a distribuição, o tamanho, e até mesmo a forma de nanopartículas em solução. Por se tratar de uma formulação cuja as partículas são coloidais, esta técnica utiliza o movimento Browniano, característico de partículas em solução, para detectar as flutuações da intensidade de espalhamento. O DLS também é definido como espalhamento quase elástico da luz e espectroscopia de correlação de fótons (Holoubek, 2007; Nobbmann *et al.*, 2007).

Através da técnica de DLS foi avaliado o tamanho da partícula, o índice de polidispersão (IPd) e o potencial Zeta, cujos valores podem ser observados na tabela 1. No que se refere ao tamanho da partícula, ambos os compostos apresentaram resultados satisfatórios, preferencialmente estando abaixo dos 220 nm, tal preferência, a primórdio, seria para possibilitar a filtração dessas formulações, o qual precisam estar em condições estéreis para entrar em contato com a cultura celular.

O IPd sugere o grau de homogeneidade de um sistema referente aodímetro das partículas em suspensão, em outras palavras, é analisado as variações de tamanho entre as partículas de uma formulação (Nobbmann, 2014;Bera, 2015). Os valores variam de 0 a 1, sendo quanto mais próximo de 0 mais homogêneo o sistema, ou seja, as partículas apresentam tamanhos aproximados, enquanto que, quanto mais próximo de 1 mais polidispersa é a formulação. Os resultados de IPd dos compostos CL e PP foram satisfatórios, apresentando valores mais próximos a 0.

O potencial Zeta é um indicativo da carga superficial da partícula, o valor eletrostático de tipicamente ± 30 mV fornece uma indicação quanto a estabilidade da suspensão. Ou seja, valores de potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto que valores acima de -30 mV e abaixo de +30 mV são instáveis, indicando que as formulações podem flocular interferindo na atividade do composto (Robert *et al.*, 2017). Com relação aos

resultados apresentados pelos compostos na tabela 1, os valores de potencial Zeta são satisfatórios. Sendo assim, com base nos três resultados obtidos, ambas as formulações foram consideradas adequadas para serem testadas.

Tabela 1. Preparação dos compostos bioativos CL e PP preparados isoladamente em nanoemulsões.

Compostos Bioativos Nanoemulsionados			
	Tamanho(nm)	IPd	Potencial Zeta (mV)
CL	107.8 ± 0.9815	0.297 ± 0.030	-13.5±0.721
PP	139.9 ± 0.2082	0.301 ± 0.006	-36.6 ± 0.361

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Análise de MTT

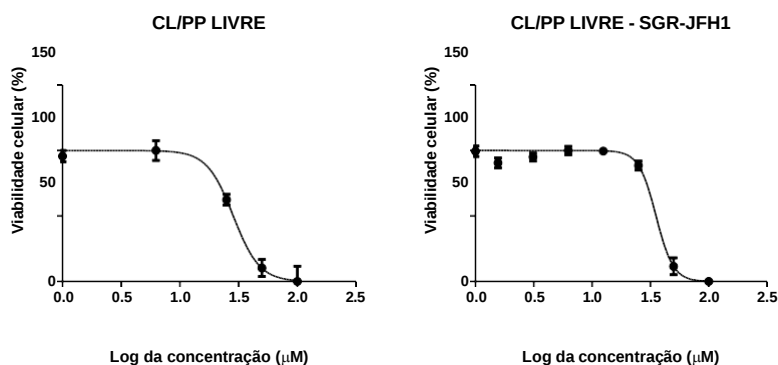
Os ensaios de MTT e Vermelho Neutro foram utilizados estabelecendo uma escala de citotoxicidade, afim de determinar a concentração inibitória média (IC₅₀) da curcumina e piperina (CL/ PP) 20:1 livres e nanoemulsionadas em células de hepatocarcinoma, Huh 7.5 e SGR-JFH1. Como já mencionado anteriormente, o ensaio de MTT fundamenta-se na atividade de desidrogenases mitocondriais de células viáveis que reduzem metabolicamente o sal de MTT (coloração amarela e solúvel em água), em cristais de formazan (cor azul púrpura e insolúvel em água), que se acumulam no citoplasma celular (Li; Song,2007). Portanto, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

De acordo com a Figura 11 a viabilidade das células Huh 7.5 e SGR-JFH1, exposta à CL/PP livres, apresentaram uma média de IC₅₀ de 29,7µM +/-1,66 e 31,4 µM +/-2,79, respectivamente. Nos tratamentos com CL/PP nano, em células Huh 7.5 e SGR-JFH1, a média de IC₅₀ foi de 31,37 µM +/-4,27 e 34,29µM +/- 3,00, respectivamente, e 38,18 µM +/-0,57 e 52,9µM +/- 3,00, respectivamente, no tratamento com a nanoemulsão branca. A nanoemulsão foi a menos citotóxica, sobretudo na SGR-JFH1, apresentando uma diferença significativa em comparação com a Huh 7.5, informação que a enquadra como um bom sistema de carregamento com relação a citotoxicidade, porém a presença do vírus

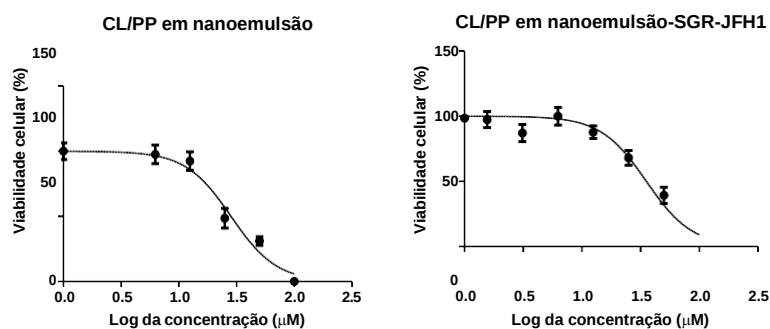
pode estar contribuindo para uma tolerância aos compostos ainda maior. As CL/PP e a CL/PP nano apresentaram um IC₅₀ próximo entre os tratamentos e entre as linhagens Huh 7.5 e SGR-JFH1. Primeiramente estes resultados indicam que ambas as células apresentam o mesmo IC₂₀, conferindo a mesma resistência aos compostos naturais.

Figura 11: Teste de MTT, concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos em células Huh 7.5 e SGR-JFH1.

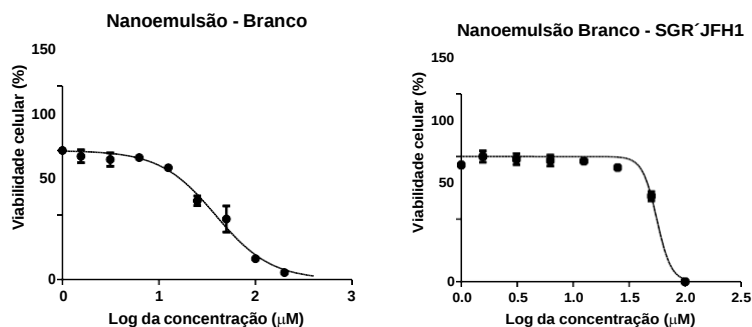
A



B



C



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Teste de MTT, concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos em células Huh 7.5 e SGR-JFH1, respectivamente, nas proporções de 20:1 de CL/PP Livre (A), CL/PP em nanoemulsão (B) e nanoemulsão branca (C). Tratadas por 24 horas em concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 μM.

O fato de não haver diferença entre os tratamentos pode indicar que a disponibilidade dos compostos nanoemulsionados não seja superior ao da CL/PP sem o carreador. Com base nos resultados obtidos e nos trabalhos encontrados na literatura (Atal *et al.*, 2016; Shoba *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2016), foi determinado 15 μM como IC_{20} , conferindo aproximadamente 80% de viabilidade celular.

4.3 Análise do Vermelho Neutro

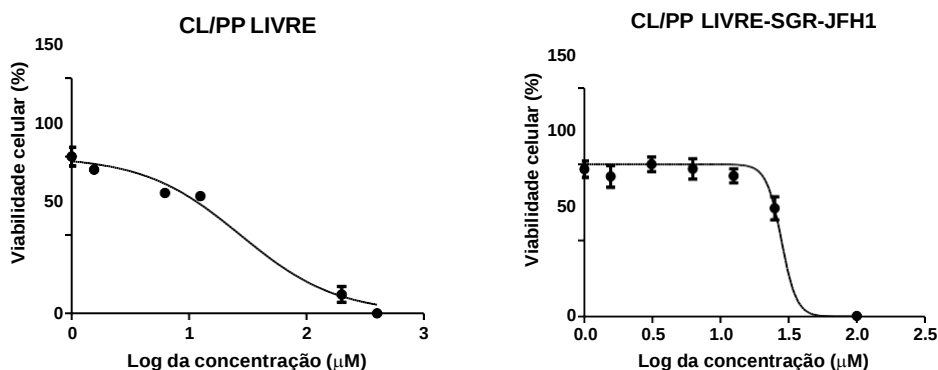
O vermelho neutro (VN), é um corante fenazina de característica catiônica, amplamente utilizado não apenas em ensaios de citotoxicidade, mas também para coloração histológica e indicador de pH intracelular (Verissimo, 2016).

O teste VN, como já mencionado, fundamenta-se na internalização do corante pelos lisossomos de células viáveis (Andrade *et al.*, 2017). O corante é um composto catiônico fraco sendo absorvido ao penetrar a membrana celular por difusão simples concentrando-se no interior dos lisossomos. O composto provoca um gradiente de prótons que gera um pH mais ácido, isto permite a ligação do corante com os grupos fosfatos e aniônicos da matriz lisossomal. Compostos tóxicos podem alterar estruturas membranosas celulares, isso faz com que as células que sofrem danos às membranas, ou superfícies, percam a capacidade de aprisionamento do corante, o que reduz sua quantidade na cultura. Assim, a toxicidade celular se expressa por uma redução da concentração de corante, após a exposição das células à uma substância teste, sendo que quanto maior a concentração de vermelho neutro nos lisossomos, maior a quantidade de células viáveis, o que faz deste teste uma excelente opção para ensaios de citotoxicidade (Andrade, 2017).

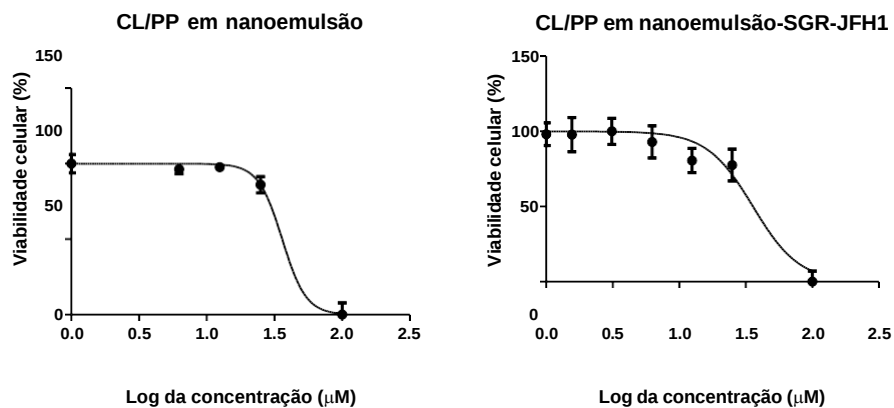
De acordo com a Figura 12 a viabilidade das células Huh 7.5 e SGR-JFH1, exposta à CL/PP livres, apresentaram uma média de IC_{50} de 29,26 μM $\pm$ 2,5 e 29,4 μM $\pm$ 1,4, respectivamente, e para os tratamentos com CL/PP nano tal média foi de 32,86 $\pm$ 4,27 μM e 34,11 μM $\pm$ 1,24, respectivamente, e 39,59 $\pm$ 2,25 e 50,6 μM $\pm$ 2,44, respectivamente, para a nano branca. Estes valores corroboram com os resultados obtidos pelo ensaio de MTT, o valor de concentração de 15 μM é a média do IC_{20} de ambos os testes de citotoxicidade.

Figura 12: Teste de VN, concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos em células Huh 7.5 e SGR-JFH1

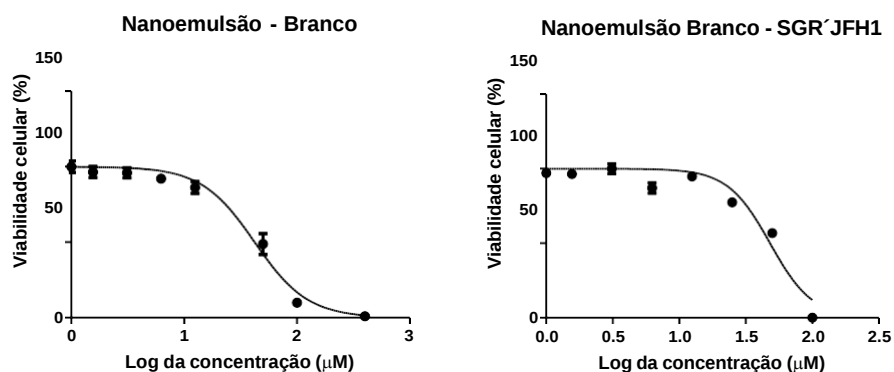
A



B



C



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Teste de VN, concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos em células Huh 7.5 e SGR-JFH1, respectivamente, nas proporções de 20:1 de CL/PP Livre (A), CL/PP em nanoemulsão (B) e nanoemulsão branca (C). Tratadas por 24 horas em concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 μM.

4.4 Teste de Internalização por Citometria de Fluxo

A nanoemulsão demonstrou ser um sistema de entrega eficiente, com

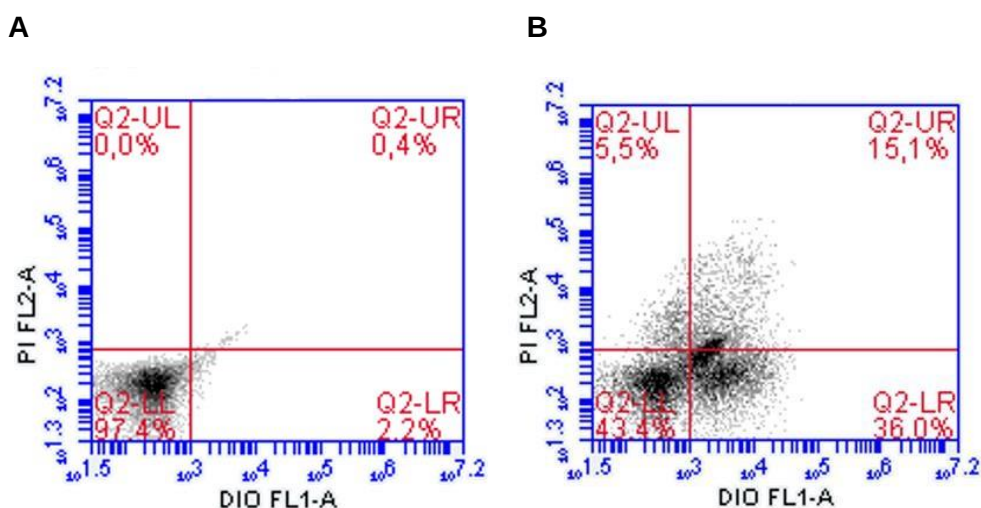
uma média percentual de internalização de 34%, conforme pode ser observado

na Figura 13. Os quadrantes inferior e superior esquerdo representam as células não marcadas, viáveis e em processo de morte respectivamente, ou seja, estas populações não receberam o marcador DIO via nanoemulsão.

Enquanto o quadrante superior direito indica as células não viáveis com o DIO internalizado, porém esta porcentagem é desprezível, pois as células estão em processo de morte e a membrana plasmática já perdeu a permeabilidade seletiva, o que naturalmente permite a absorção da nanoemulsão.

Já o quadrante inferior direito, representa a população de células viáveis que receberam o marcador fluorescente, este percentual é o que de fato revela a eficiência de internalização do sistema em questão, indicando um potencial de entrega acima de 30%. Urge salientar, que este percentual de internalização não foi citotóxico às células Huh 7.5, inclusive demonstrou uma citotoxicidade similar à CL/PP livre. Dessa forma, podemos observar uma entrega efetiva do nanosistema e com baixo efeito citotóxico.

Figura 13: Percentual de internalização da nanoemulsão em células Huh 7.5.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Gráficos de pontos de citometria de fluxo representativos de dados derivados de DIO e PI incorporado às células Huh 7.5. (A) controle negativo, células expostas apenas a DEMEM. (B) células após 24 horas de exposição ao DIO, indicando um média de internalização de 34%

As imagens da análise de confocal, item 4.6 (Figura 134), corroboram com os resultados deste teste, demonstrando que a CL nanoemulsionada de fato foi absorvida pela célula, descartando a hipótese de que o sistema de nanoemulsão,

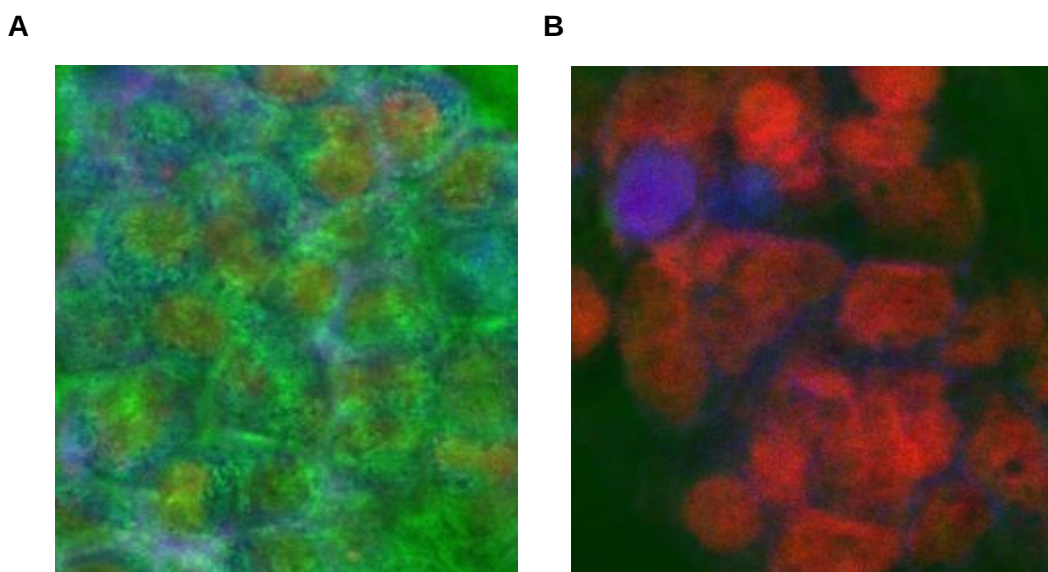
ao invés de internalizar, estivesse apenas interagindo com a membrana plasmática no meio extracelular.

4.5 Análise Confocal

Para a técnica de confocal a própria CL foi utilizada como marcador do nanosistema. O espectro de absorção da curcumina consiste em apenas uma banda característica na região da luz visível (400-420 nm) (Bonfim *et al.*, 2020). Com base no fato de que a curcumina apresenta fluorescência natural entre 450-700 nm com excitação fixada em 458 nm, avaliamos a internalização de nanoemulsões por células Huh 7.5 usando microscopia de fluorescência.

Após 24 horas de incubação com 15 μ M de CL nanoemulsionada, as células exibiram fluorescência verde por todo o citoplasma (Figura 14). O marcador de tubulina foi utilizado para fornecer a visualização de todo o entorno da célula (**B**) e assim compararmos com o que estava sendo observado na imagem **A**.

Figura 14: Imagem do confocal da internalização da CL em células Huh 7.5.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Imagem da internalização da CL na célula Huh 7.5, expostas por 24 horas a 15 μ M de CL nanoemulsionada. (**A**) as regiões em verde mostram a CL internalizada, os núcleos, marcados com nucblue, estão em azul. (**B**) células tratadas apenas com nucblur (azul) e tubulin tracker green (vermelho).

Dessa forma, com bases nas imagens, podemos concluir que a nanoemulsão não atua na membrana plasmática, no meio extracelular, mas internaliza, carregando a CL para dentro da célula. Os possíveis mecanismos de

internalização são inúmeros, pois nanocarreadores lipídicos podem interagir com as células de várias maneiras, incluindo endocitose, transcitose e até fusão de membrana (Haddadzadegan; Dorkoosh; Bernkop-Schnürch, 2022). Sendo assim, para esclarecer as vias de internalização deste sistema é necessário estudos mais aprofundados.

4.6 Análise qualitativa das proteínas NS5A, p62 e HIF-1 α por Western Blotting

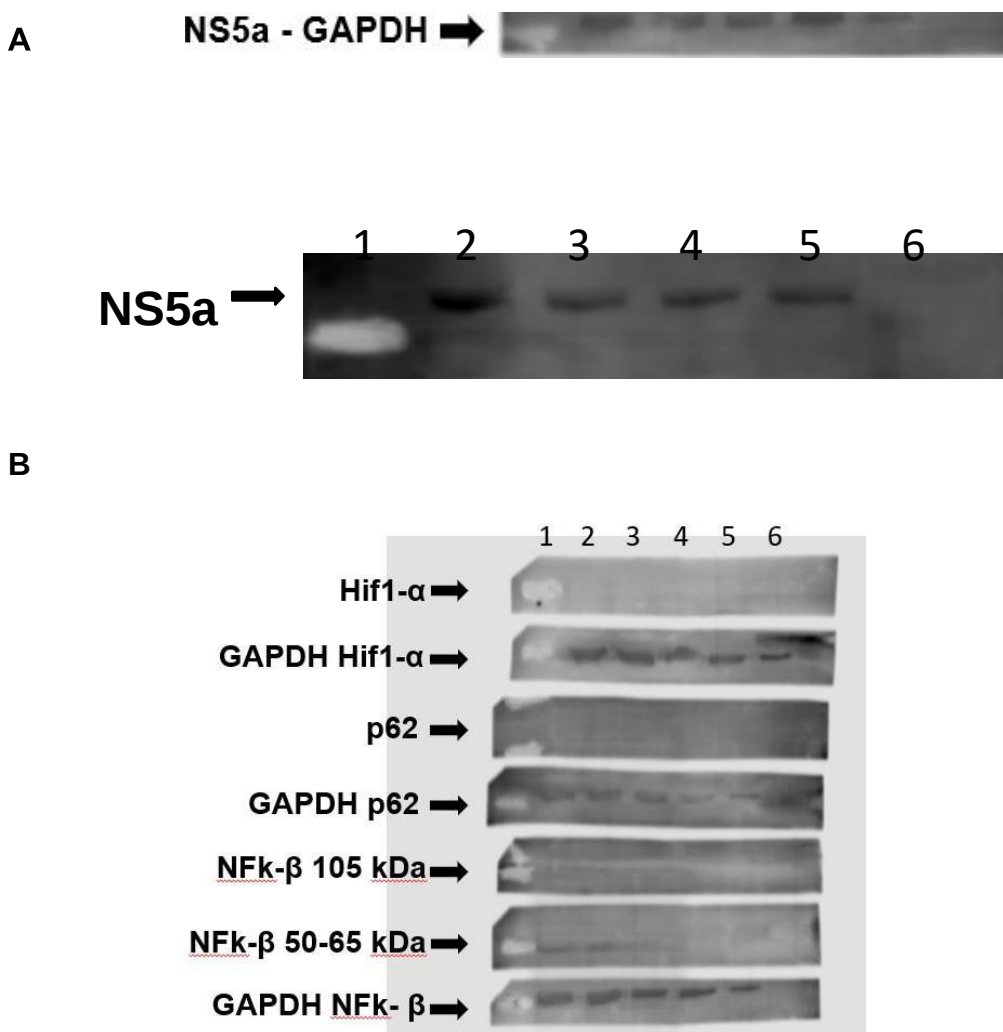
Como já mencionado o *western blotting* é um método semiquantitativo para avaliar o grau de expressão de proteínas de interesse. A técnica consiste na ligação de um anticorpo primário específico para cada proteína alvo. Para a reação acontecer é necessário que o anticorpo primário se ligue ao anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, esta enzima catalisa o quimioluminescente (luminol) gerando aminoftalato e luz. O sinal emitido pela reação é proporcional à quantidade de proteínas contidas na amostra, o qual é detectado pelo sistema de documentação, o scanner de membranas. A escolha das proteínas alvo deste trabalho foi especulativa, baseada em levantamentos bibliográficos que nos permitiu criar uma hipótese de quais mecanismos o vírus HCV estaria utilizando para manter a viabilidade celular ao longo da infecção.

Segundo Irshad *et al.*, (2017), o Hif-1 α é uma via importante para células em estado de hipóxia e esta condição pode ser gerada pela infecção do HCV. A proteína p62 é um importante marcador de mitofagia, que foi escolhida na esperança de mostrar um panorama do ritmo de degradação mitocondrial que, provavelmente, o vírus possa provocar. E por fim, a NS5A, uma importante fosfoproteína essencial ao HCV, da qual sabe-se tão pouco.

Ao observarmos as bandas dos géis da Figura 15 podemos concluir que nenhum dos tratamentos afetaram a expressão destas proteínas, apresentando o mesmo padrão que a célula SGR-JFH1 e Huh 7.5 sem tratamento. Contudo, há relatos na literatura a respeito da curcumina provocar a supressão da expressão de HIF-1 α , inclusive consta que esta proteína é abundante em células tumorais e em tecidos em processo de fibrose, o que contradiz o fato da inexistência de banda na Huh 7.5, uma célula tumoral (Bahrami *et al.*, 2018). Outro estudo também constatou o efeito regulatório da curcumina sobre o HIF-1 α nos tecidos cerebrais de ratos submetidos a condições de hipóxia (Sarada *et*

al., 2015). Segundo Viswanadha et al. (2020) a piperina regulou a via do HIF-1 α na inflamação induzida por isoproterenol em tecidos cardíacos de ratos, segundo os autores o pré-tratamento com piperina impediu o quadro de inflamação.

Figura 15: Expressão proteica em células SGR-JFH1 e Huh 7.5 após tratamento com os CNBs e nano branca, em membranas de nitrocelulose, por western blotting.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em células SGR-JFH1 nas imagens A e B colunas 2 a 5: (1) Peso molecular; (2) Tratamento com CL/PP livre; (3) Tratamento com CL/PP nano. (4) Tratamento com nano branca; (5) SGR-JFH1 sem tratamento; (6) Huh 7.5 sem tratamento.

Referente a proteína p62, estudos mostraram que a curcumina diminuiu os níveis de expressão da p62 e reverteu o fluxo autofágico em ratos com diabetes mellitus. Já em testes *in vitro* de lesão de perfusão isquêmica, a curcumina diminuiu os níveis de HIF-1 α e aumentou os níveis de expressão de p62 (Forouzanfar *et al.* 2019). Segundo Jim *et al.* (2022) a curcumina promoveu

a expressão de p62 em tecidos ósseos em condições de osteoartrite. Este levantamento bibliográfico revela que a relação causa/efeito da curcumina sobre a mesma proteína pode mudar de acordo com o cenário metabólico em que o composto se encontra.

O NF- κ B também sofre influência da ação dos compostos em questão. Estudos sugerem que a piperina é capaz de se ligar ao sítio ativo do NF- κ B e impedir sua translocação para o núcleo. Há muitos estudos que comprovam a ação inibitória da curcumina sobre o NF- κ B, o qual além de atuar no sítio de ligação do NF- κ B, evitando sua translocação para a região nuclear, o composto também inibe a expressão e consequentemente reduz os níveis de NF- κ B (Gachpazan *et al.*, 2021; Laurindo *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2019; Altinel *et al.*, 2020).

Por fim, com relação a NS5A, não há nada na literatura que relacionou o efeito dos CNBs em questão com a atividade e expressão desta fosfoproteína. O fato de as bandas estarem presentes em todos os tratamentos e não apenas no controle negativo nas células SGR-JFH1 não comprova, necessariamente, que os compostos naturais não geraram efeito. Como já mencionado a NS5A é uma fosfoproteína dividida em uma região hiper e hipofosforilada, as regiões de fosforilação bem como as suas funções ainda são pouco conhecidas, o que, provavelmente, é a razão de não haver anticorpos anti-NS5A fosforilados disponíveis no mercado. Isto limita os nossos resultados, pois o fato dos compostos não estarem atuando na expressão não significa que os CNBs não interferiram na atividade da NS5A agindo sobre a sua fosforilação.

Dessa forma, é necessário direcionar mais estudos sobre a NS5A e também sobre as demais proteínas, alvo deste estudo, cuja as bandas não foram evidenciadas, mas a literatura indica a ação destes compostos sobre elas. O fato de nenhuma delas ter sido detectada por esta técnica, sobretudo nos controles negativos, revela a necessidade de ajustarmos o protocolo com o intuito de aumentar a sensibilidade e melhorar a detecção destas proteínas.

4.7 Análise quantitativa de PCR em tempo real (*qPCR*) da carga viral.

É possível observar na Figura 16 que em 24 horas de incubação, o tratamento com CL/PP livre e CL/PP nano, em pellet, apresentaram inibição da síntese viral intracelular, demonstrando uma diminuição de 2.595 vezes em comparação com o controle negativo, ambos os tratamentos responderam da mesma forma, sem diferenças significativas ($p < 0,005$). Já o tratamento com a nano branca gerou um aumento de 333,4 vezes em comparação ao controle negativo. Em contrapartida, o índice de carga viral nos sobrenadantes tratados com CNBs permaneceram sem diferenças significativas em comparação ao controle negativo, excetuando a nano branca, que apresentou um aumento de 18,8 vezes em comparação ao controle.

Tais resultados demonstram a indiscutível relevância do trabalho. Como já mencionado, Kim et al (2010) testaram a atividade da curcumina em faixa de concentração de 5 a 15 μM em células SGR-JFH1, e observaram uma redução da carga viral em 40% em relação ao controle. Outros trabalhos divulgaram uma redução de 50% do RNA-HCV após tratamento com CL, na concentração de 20 μM , em células SGR-JFH1, marcado com luciferase (Chen *et al.*, 2012).

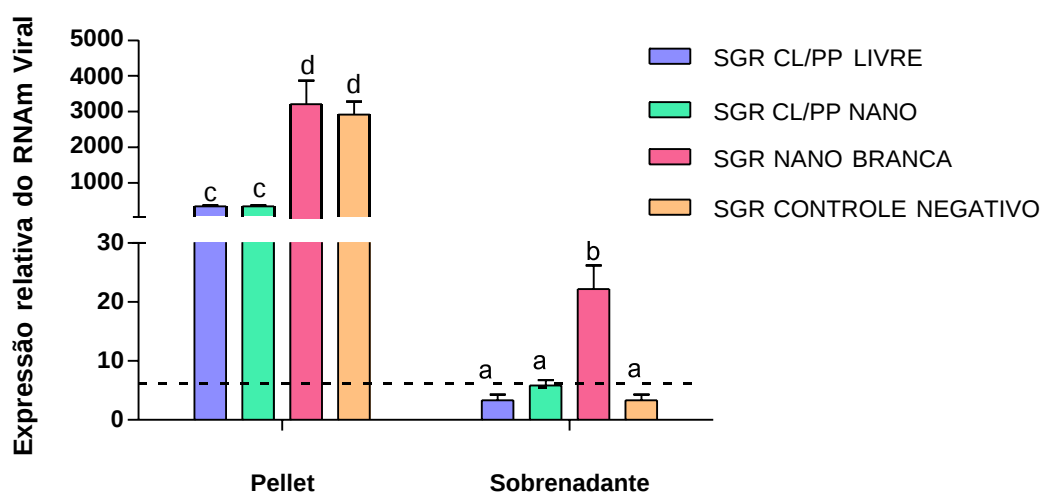
Há outros trabalhos que relataram que estudos *in vitro* da atividade antiviral de células SGR-JFH1 indicaram que a curcumina pode ser um composto anti-HCV potente. Além disso, estudos já foram feitos, associando a curcumina com os antivirais a base de IFN α , resultando em uma severa inibição da replicação do HCV e comprovando que é possível o uso de CNBs como terapias adjuvantes para a doença (Tung *et al.*, 2019).

Curiosamente a CL/PP nano não aumentou a síntese de replicação do HCV como a nano branca. Não foi surpresa a nano branca apresentar este efeito, já que a principal via utilizada no ciclo do HCV é a via lipídica e a nano branca, sendo composta por lipídios, acabou acentuando a expressão da carga viral. Porém o efeito da curcumina e a piperina foram dominantes e parecem ter sobrepujado o efeito positivo que a nano branca teria exercido sobre o vírus, a ponto de não ter sido observado diferença no efeito inibitório da replicação do HCV entre a CL/PP livre e CL/PP nano.

Infelizmente, até o momento, não há nada na literatura ligando o efeito da piperina no ciclo de replicação do HCV. O mais próximo que temos é o trabalho da, atualmente doutora, Rute Lopes (2019), Processo Fapesp 2017/004500-9, tendo estudado o efeito da piperina isoladamente e relatado o seu efeito antiviral sobre o HCV. Além disso, seu trabalho também constatou que a biodisponibilidade da curcumina aumentou quando associada à piperina.

O efeito da piperina sobre a biodisponibilidade da curcumina já se faz conhecida na literatura, seus estudos tem sido cada vez mais abrangentes devido aos seus relevantes efeitos na área da saúde (Heidari *et al.* 2023; Servida *et al.* 2023; Miryan *et al.* 2021). O evidente efeito anti-viral destes compostos é um exemplo desta relevância, sobretudo no caso da curcumina, o qual ao se levar em conta sua baixa absorção devido a insolubilidade em água, principalmente quando a sua principal via de administração é oral, faz da piperina um fator determinante para se ter sucesso nos tratamentos com CNBs desta natureza (Assis *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2016; Heidari *et al.* 2023).

Figura 16: Índice de carga viral de RNA do HCV em meio intracelular e sobrenadante de células SGR após tratamentos com CNBs.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para a determinação da carga viral do meio intra e xtracelular em células Huh 7.5 SGR-JFH1, expostas por 24 horas a 15µM de CL/PP livre (barra azul), CL/PP Nano (barra verde) e nano branca (barra rosa). O controle negativo da Huh 7.5 SGR-JFH1 foi exposto apenas ao meio de cultura (barra laranja). Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos. ANOVA e teste de Bonferroni foram usados ($P < 0,05$). Os dados estão apresentados como média e erro padrão de média (barras).

4.8 Análise quantitativa de PCR em tempo real (*qPCR*) das I-SMADS e VAP-A.

Todos os tratamentos e os controles negativos, tanto da Huh 7.5 quanto da SGR-JFH1, demonstraram níveis significativos na expressão de SMAD 6, apresentando diferenças consideráveis entre si, sendo o tratamento com a nano branca o mais responsivo. Os controles negativos da Huh 7.5 e da SGR-JFH1 demonstraram um aumento na expressão da SMAD 6 de 206,6 e 45 vezes maior, respectivamente, que o gene de referência GAPDH. Tal resultado revela que esse gene está envolvido em outras vias metabólicas importantes para as células de hepatocarcinoma e não apenas em casos circunstanciais, como na invasão de um vírus.

A expressão da SMAD 6 está relacionada à regulação negativa do fator transformador de crescimento β (TGF- β), uma citocina multifuncional que regula a expressão de mais de 500 genes (Dzieran *et al.*, 2014), envolvida em diversas funções celulares, como proliferação, apoptose, diferenciação e homeostase de tecidos adultos (Jung *et al.*, 2013; Seoane; Gomis, 2017).

O TGF- β é proeminente em fígados debilitados e atua como um regulador chave na atuação de células estreladas hepáticas e na fibrogênese da maioria dos danos hepáticos. No início do desenvolvimento das lesões, tal citocina apresenta efeitos citostáticos, induzindo a apoptose em diferentes tipos de hepatócitos e interferindo na proliferação destas células durante a regeneração do fígado. Contudo, durante o processo em que a lesão hepática crônica se desenvolve para um estágio de cirrose ou mesmo carcinoma hepatocelular, o TGF- β muda de comportamento, passando de uma função citostática para oncogênica, o qual induz a transição mesenquimal epitelial, produção de citocinas e receptores, migração e invasão (Dzieran *et al.*, 2013; Seoane; Gomis, 2017).

Ou seja, o TGF- β apresenta uma natureza pleiotrópica, o qual, dependendo do contexto celular e sua integração com outras cascatas de sinalização, esta citocina pode agir como um fator supressor de tumor, inibindo a proliferação celular e estimulando a diferenciação em células saudáveis. Em contrapartida, em um ambiente de câncer avançado, induz a progressão do tumor e metástase, servindo assim como um agente oncogênico (Seoane; Gomis, 2017; Tsuchiya, 2022).

O TGF- β é a citocina fibrogênica mais relevante e classicamente atua na transmissão intracelular via proteínas smads (Gungor; Uysal; Senturk, 2022). Sendo assim, é necessário que sua sinalização seja cuidadosamente regulada afim de manter a homeostase tecidual, pois sua hiperativação ou sua hipoativação está altamente relacionada a doenças humanas, incluindo o câncer (Jung *et al.*, 2013; Gungor; Uysal; Senturk, 2022). Tais descobertas têm levantado maiores estudos sobre as I-SMADS (smad 6 e 7), pois são responsáveis pela regulação negativa do TGF- β .

O TGF- β possui duas formas de sinalização; através das vias canônicas dependentes de smad e não canônicas independentes de smad. Canonicamente, o TGF- β liga-se aos receptores TGF- β tipo II (T β RII) que subsequentemente recrutam e ativam os receptores tipo I T β RI/ALK-5 por fosforilação, levando à fosforilação C-terminal das R-Smads, como a Smad 2 e a Smad 3. A fosforilação de R-Smads resulta na formação de um complexo heteromérico com a Smad 4 e seguidamente translocam-se para o núcleo onde atuam como fatores de transcrição em conjunto com co-ativadores e co-repressores. As SMADs 6 e 7, possuem um papel inibitório na sinalização das R-SMAD (Bi Shaikh; Bhat; Bhandary, 2020). Já as vias não canônicas incluem diversas moléculas de sinalização intracelular, como quinase 1 associada a TGF- β (TAK1), proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK), quinase N-terminal c-Jun (JNK), quinase regulada por sinal extracelular (Erk), Rho- GTPase e Akt5–13, mas não as R-Smads (Dzieran *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2013; Seoane; Gomis, 2017).

A maioria dos trabalhos estão focados em estudar a regulação negativa da via canônica do TGF- β dependente de Smad para revelar que as I-Smads atuam como suas antagonistas, sobretudo a Smad 7, que induzida pelo TGF- β 1 recruta um fator regulador de ubiquitina de proteínas smads (Smurf), o qual suprime a via canônica do TGF- β através da degradação proteasomal mediada pela ubiquitinação. Já o papel da smad 6 na via canônica do TGF- β não foi estudado com a mesma profundidade, pois tem sido reconhecida, principalmente, como um importante antagonista da proteína morfogênica óssea (BMP), cuja sinalização também induz a degradação de R-Smads via recrutamento de Smurfs. Outro evento ainda menos estudado é a regulação negativa da via não canônica do TGF- β (Jung *et al.*, 2013). Segundo Jung *et al.* (2013), a smad 6 é

a principal responsável pela regulação negativa do TGF- β não-canônico via TGF- β 1-TRAF6-TAK1-p38 MAPK/JNK.

Estas informações são importantes para entendermos o motivo da smad 6 ser altamente expressa nos controles negativos, principalmente na Huh 7.5. Segundo Dzieran (2013), Zou *et al.*, (2021) e Radmanić *et al.* (2022), os níveis de TGF- β são altos em hepatocarcinomas, inclusive em células Huh, o qual nestas também foi constatado, segundo Radmanić *et al.* (2022), altos níveis de smad 6. Sendo assim, com base nessas informações, podemos indagar que altos níveis de expressão de smad 6 são uma resposta aos altos níveis de TGF- β , cujo o excesso já espera-se encontrar em hepatocarcinomas, e a Huh 7.5 não é exceção.

Outro fato interessante é que a SGR-JFH1 apresentou níveis significativamente menores de smad 6 que a Huh 7.5. Essa reação provavelmente está ligada à interferência do vírus na célula. Segundo Zou *et al.*, (2021), embora o TGF- β seja essencial na progressão da doença hepática, incluindo lesão hepática inicial, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, o TGF- β , tanto nas vias canônicas dependentes de Smad quanto na não canônica independentes de Smad, suprime a replicação do RNA do HCV através da interrupção de vários estágios ao longo de todo o ciclo de vida do vírus, desde a entrada do HCV nos hepatócitos até os estágios de replicação intracelular. Tal estudo nos permite teorizar que a depleção dos níveis de smad 6 ocorreu porque os níveis de TGF- β , provavelmente, também diminuíram, pois não seria incomum deduzir que o vírus passaria a combater esta citocina. Além disso, o HCV é beneficiado com a ativação da smad 6, não apenas por sua ação inibitória sobre o TGF- β , mas pelo seu importante papel no aumento dos níveis de proteoglicanos de sulfato de heparano na superfície celular para captação de colesterol (Zhang, *et al.*, 2017), o que explicaria os altos níveis de expressão de smad 6 em células SGR-JFH1, mesmo após uma depleção considerável ao compararmos com o controle da Huh 7.5.

Como já mencionado, porém é importante salientar, que a smad 6 está envolvida na cascata de sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (Goumans *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). As BMPs são um grupo de fatores de crescimento classificados na superfamília TGF- β (Wozney *et al.*, 1988; Massague, 1990). Embora essas moléculas tenham sido inicialmente

descobertas por sua capacidade de induzir a formação de tecido ósseo, cartilagem e participar do reparo ósseo, atualmente é conhecida também por sua ação no processo de embriogênese, no desenvolvimento de órgãos, bem como na manutenção da homeostase do tecido adulto (Chung *et al.*, 2018).

A smad 6 é um inibidor intracelular que atua, predominantemente, na via de sinalização BMP, de forma mais presente do que na sinalização do TGF- β (Goumans *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). A ativação da BMP-2 e 4 também está associado ao tecido adiposo visceral (gordura branca) (Zhao *et al.*, 2002) e desempenha um papel importante na adipogênese e diferenciação de adipócitos (Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). A BMP-2 também é um regulador negativo na proliferação de hepatócitos, atuando na regeneração do fígado, regulando negativamente a fibrogênese do órgão. Estudos mostraram que a BMP-2 minimizou a fibrose intersticial renal via antagonização dos sinais pró-fibrogênicos induzidos por TGF- β 1 (Xu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011).

É plausível que a expressão exorbitante de smad 6, tanto em Huh 7.5 quanto em SGR-JFH1, também esteja ligada a BMP-2. Estudos tem relacionado o papel fundamental da BMP-2 no desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares. Segundo Zheng *et al.* (2014), a BMP-2 exerce um efeito inibitório no crescimento e migração em células de hepatocarcinomas, outro estudo, como o de Liu *et al.* (2021), afirmou que a superexpressão de BMP-2 atua contra a proliferação e metástase do carcinoma em questão.

Por outro lado, outros autores como, Gou; Gou e Zheng (2021), constataram que as células de hepatocarcinoma possuem alta expressão de BMP-2, o qual esta atua positivamente na manutenção de células tronco cancerígenas. O estudo de Jiang *et al.* (2023), também constatou que a BMP-2 pode promover a proliferação e invasão de células de hepatocarcinoma, contribuindo para a progressão maligna do câncer. Todas estas informações contraditórias da BMP-2, nos leva a supor que esta citocina apresenta o mesmo comportamento plástico que a TGF- β , ou seja, a depender do contexto metabólico em que esta inserida sua atuação muda de forma antagônica, passando de um agente anti-tumoral para um agente oncogênico.

É necessário ponderar que estes trabalhos utilizaram linhagens diferentes de hepatocarcinoma, o que pode ter contribuído com conclusões tão distintas,

inclusive a linhagem de células Huh não foi testada em nenhum destes trabalhos, o que afirma a necessidade de maiores estudos.

Infelizmente não há nada na literatura que ligue as BMPs com os altos níveis de smad 6 em células Huh 7.5 e muito menos em células SGR-JFH1. O que nos impossibilita de interpretar os resultados de forma mais assertiva. A escassa informação na literatura somada à natureza dúbia das vias BMPs e TGF- β , dificulta a interpretação destes resultados. Dessa forma, o que podemos concluir com os resultados dos controles negativos na expressão de smad 6 é que as vias de BMPs e TGF- β podem estar relacionadas, não sabemos ao certo se ambas ou apenas uma delas, na expressão da smad 6, e se a sua regulação sobre esta smad é positiva ou negativa. Além disso, não podemos excluir a possibilidades de outras vias, pouco estudadas ou até desconhecidas, estarem atuando fortemente na via da smad 6.

Os tratamentos com a CL/PP livre Huh 7.5, CL/PP nano SGR-JFH1 e CL/PP nano Huh 7.5 apresentaram uma expressão significativa de SMAD 6 de 108, 92 e 78 vezes ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao gene de referência GAPDH. Contudo, quando comparamos com o controle negativo da Huh 7.5 com a CL/PP livre da Huh 7.5 e a CL/PP nano Huh 7.5, observamos que houve uma diminuição na expressão da smad de 98 e 128 vezes, respectivamente, enquanto que a smad 6 da SGR-JFH1 CL/PP livre apresentou um aumento na expressão de 47 vezes em comparação com o controle negativo SGR-JFH1. Curiosamente, a SGR-JFH1 nano apresentou uma diminuição na expressão de smad 6 de 23,4 vezes em comparação com o controle negativo SGR-JFH1.

É importante ressaltar que a curcumina regula a atividade dos principais marcadores inflamatórios como TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, entre outros (Zhang *et al.*, 2015; Gouda; Prabhu; Bhandary, 2018).

Como mencionado anteriormente, a via de sinalização TGF- β 1/Smad inicia-se com a ligação do TGF- β 1 ao receptor TGF- β 1 tipo II (T β RII). A T β RII induz o recrutamento e fosforilação da T β RI, crucial para a fosforilação das smads 2 e 3, que podem se complexar diretamente com a smad 4. O complexo entra no núcleo, intervindo na transcrição de múltiplos genes. Durante este processo, a smad 7 possui um papel inibitório na última fosforilação, competindo com a smad

2 e 3 pela ligação com a T β RI; (Meng *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018; Dewidar *et al.*, 2019).

Segundo Bi Shaikh, Bhat e Bhandary (2020), camundongos tratados com curcumina apresentaram níveis de TGF- β 1 reduzidos, sendo observado um aumento dos níveis de SMAD 6 e 7.

Outros estudos também mostraram que a curcumina diminuiu a expressão de TGF- β em hepatócitos, causando uma interrupção na transdução do sinal transmitido pela via das SMADs. Além disso, verificou-se que a fosforilação das smads 2 e 3 foi inibida pela curcumina (Avila-Carrasco *et al.*, 2019). Segundo a trabalho de Junyu *et al.*, (2019) foi observado esse mesmo efeito da curcumina sobre o TGF- β em outros tecidos. Além disso, segundo Fonseca *et al.* (2020), a piperina também levou a baixas expressões de TGF- β em células de adenocarcinoma pulmonar humano. Infelizmente não há descrito na literatura o efeito destes compostos naturais na via das smads em células infectadas com o vírus da hepatite C.

Resumindo, a CL/PP livre da Huh 7.5, CL/PP nano da SGR-JFH1 e a CL/PP nano da Huh 7.5 apresentaram relativa diminuição de smad 6, e seus níveis de expressão não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,0001$). Com uma visão mais superficial destes resultados, poderíamos concluir que estes não corresponderam as informações constatadas na literatura, porém a observação de níveis menores de smad 6 pode ser uma resposta a diminuição da expressão do TGF- β e não necessariamente da expressão de smad 6 em si. Ou seja, menos TGF- β a ser inibido, menos smad 6 precisa ser expressa, mesmo que esta smad esteja sendo induzida pela curcumina e piperina. É possível que nestes tratamentos os níveis de smad 6 sejam muito superiores aos níveis de TGF- β , cenário que pode ser o completo oposto nas células controles, o qual por mais que os níveis de smad 6 são maiores, é possível que a causa seja um efeito compensatório aos altos níveis de TGF- β .

Obviamente, que tais indagações são apenas conjecturas, são necessários estudos mais aprofundados para esclarecer se tais hipóteses procedem, inclusive é necessário investigar o resultado da CL/PP livre da SGR-JFH1, o qual, curiosamente, foi o único tratamento com os compostos bioativos que tiveram níveis aumentados de smad 6. Poderíamos supor que a composição da nano seja a responsável, porém este aumento não foi observado na CL/PP livre

da Huh 7.5, o que nos leva a crer que há muito outros fatores envolvidos referente à presença do HCV. Considerando que o vírus gera um cenário de extrema alteração da maquinária celular, isto abre um leque de possibilidades sobre as vias em que os compostos naturais e a nanoemulsão estão influenciando na expressão de smad 6.

Como já mencionado, o tratamento com a nano branca elevaram os níveis de smad 6 nas células Huh 7.5 e SGR-JFH1 em 241 e 86,7 vezes, respectivamente, em comparação ao gene de referência GAPDH. Houve um aumento de 35 e 41,7 vezes quando comparado aos controles negativos. Já a smad 7 apresentou níveis elevados de expressão apenas na CL/PP livre da SGR-JFH1, um aumento de 5,18 vezes em comparação ao controle negativo. Todos os outros tratamentos, inclusive a nano branca, mantiveram níveis de expressão muito próximos ao controle GAPDH.

Estudos recentes descobriram que pacientes com obesidade e síndrome metabólica (Son, *et al.*, 2011) possuem níveis séricos de BMP-4 significativamente aumentados, mas que foram reduzidos após perda de peso (Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Um estudo *in vivo* relatou a expressão aumentada de BMP- 4 na esteatose hepática, induzida por ácido oleico (OA) por dieta rica em gordura, e constatou que a BMP-4 pode aliviar a esteatose hepática (Peng *et al.*, 2019).

Estes dados nos permitem teorizar que a BMP-2 possa sofrer influência dos níveis de colesterol, devido ao seu papel no tecido hepático, além do fato de atuar em vias metabólicas convergentes à BMP-4, o qual este já se revelou sensível à concentração deste esteroide. Sendo assim, é possível que a nanoemulsão tenha aumentado a atividade da BMP2 e provavelmente, por consequência, favorecido uma maior expressão de smad 6. Segundo Takase *et al.*, a BMP 2 aumenta os níveis de expressão da smad 6, mas não da smad 7, esta é expressa de forma antagônica somente pela via TGF- β .

Os resultados de Li; Wu (2020), demonstram que a inibição da síntese de colesterol leva a depleção de jangadas lipídicas, essenciais para a transdução de sinal dos receptores TGF- β (Razani, *et al.*, 2001; Le Roy; Wrana, 2005).

As jangadas lipídicas funcionam como uma plataforma de sinalização, são ricas em esfingolipídios e colesterol, sendo cruciais em diversos processos

fisiológicos e bioquímicos (Beloribi-Djefafilia; Vasseur; Guillaumond, 2016; Kraft, 2013; Li *et al.*, 2006).

Os receptores TGF- β são internalizados por endocitose dependente de clatrina como um evento regulatório chave na transdução de sinal (Li; Wu, 2020; Mitchell *et al.*, 2004; Conner; Schmid, 2003). Os receptores TGF- β ficam localizados nasjangadas lipídicas, o que faz a deficiência de colesterol prejudicar a transdução de sinal (Liu *et al.*, 2019). Ademais, foi demonstrado que a depleção do colesterol regula negativamente a expressão de T β RI, provavelmente por interferir em sua distribuição nasjangadas lipídicas. Essas alterações inibem a ativação da TGF- β 1 da via de sinalização TGF- β /Smad (Li; Wu, 2020).

Neste sentido, é possível que o colesterol, presente na nanoemulsão, esteja propiciando a fosforilação do TGF- β 1 e, conseqüentemente, inibindo a expressão de SMAD 7.

Estes dados podem nos permitir entender uma provável razão de observarmos um aumento na expressão de SMAD 6, regulada pela via BMP-2, no tratamento com a nano branca, enquanto o mesmo não ocorreu com a SMAD 7, pois sua atividade esta estritamente ligada a via TGF- β 1. Quando somado está informação com o trabalho de Abdelhamid, Selim e Zaafan (2021), o qual afirmam que a piperina também é capaz de inibir o TGF- β e aumentar a atividade da smad 7, podemos compreender melhor o provável motivo de apenas a CL/PP livre da SGR-JFH1 apresentar um aumento nos níveis de expressão da smad 7. Contudo, isso não se refletiu no tratamento da CL/PP livre da Huh 7.5, o qual apresentou uma expressão significativa, mas não maior que o gene de referência, assim como os demais tratamentos. Considerando o fato que os CNBs estimulam a expressão das I-SMADS e que o vírus também promove a expressão destes genes, devido a sua importância na captação de colesterol, é provável que a soma destes dois fatores, explique o fato do aumento da expressão de SMAD 6 e 7 ter sido identificado apenas na CL/PP livre da SGR-JFH1.

A dificuldade de se entender estes mecanismos não é incomum, afinal, vias metabólicas são extremamente complexas, dependendo de muitos fatores. Somando o fato dos estudos a respeito do colesterol e seu efeito sobre a via BMP/TGF- β /SMAD ainda serem muito escassos é natural que diferentes hipóteses sejam levantadas, sendo evidente a necessidade de mais estudos.

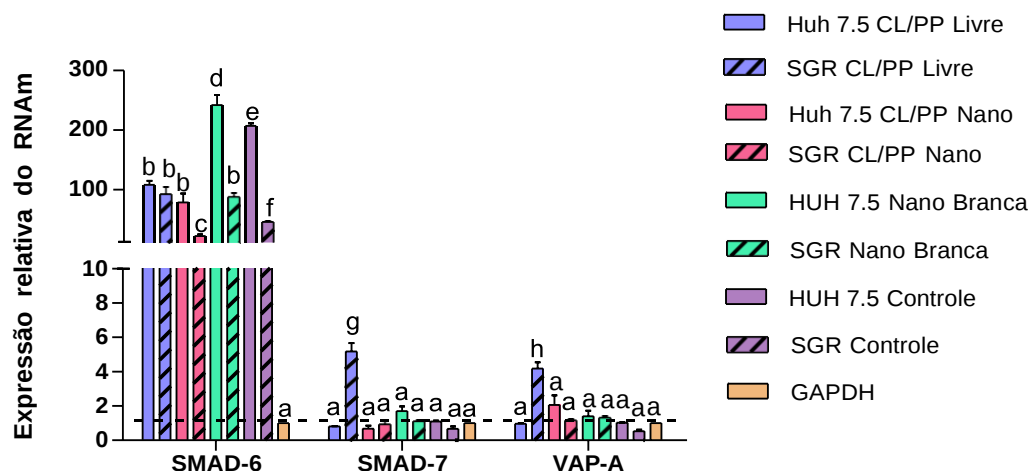
Por fim, com relação a VAP-A, apenas a CL/PP livre da SGR-JFH1 apresentou um aumento dos níveis de expressão de 4,19 vezes em comparação ao GAPDH, os demais tratamentos apresentaram expressão do gene VAP-A, mas não houve diferença significativa em comparação ao gene de referência.

Como já descrito anteriormente, a VAP-A tem como uma das principais funções a interação a múltiplas proteínas de transporte lipídico localizadas no endossomo, além de agir na transferência lipídica para outras organelas. Devido ao seu importante papel no metabolismo lipídico, sua expressão é recorrente em hepatócitos, isso explica a expressão considerável deste gene em todos os tratamentos (Barman *et al.*, 2022).

Atualmente, tem surgido novos estudos que associam a VAP-A com a NS5A do HCV. Segundo estes estudos a NS5A se liga a VAP-A para que ocorra processos fundamentais para a replicação e montagem viral (Meng-Hao *et al.*, 2019; Guodong; Xiu; Congyi, 2013; Eyre *et al.*, 2014) Contudo, de acordo com nossos resultados, não houve uma superexpressão de VAP-A em células SGR-JFH1, não apresentando diferença significativa entre as células infectadas e não infectadas ($p < 0,0001$), isso simplesmente pode indicar que os níveis normais de expressão da VAP-A em hepatócitos já é suficiente para atender as necessidades do vírus.

Já os níveis elevados da CL/PP livre da SGR-JFH1 são uma incógnita, infelizmente não há nada na literatura mencionando os efeitos da curcumina ou piperina sobre a VAP-A. Todos estes resultados nos mostram como é hiperativo a necessidade de maiores estudos sobre estas vias metabólicas e o fato de ainda sabermos tão pouco a respeito da atuação intracelular de um vírus descoberto a décadas prova como é desafiador a elucidação de tais vias.

Figura 17: Ensaio de PCR em tempo real para a determinação de RNA da SMAD 6, SMAD 7 e VAP-A em células Huh 7.5 e Huh 7.5 SGR.



Fonte:Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para a determinação de RNA da SMAD 6, SMAD 7 e VAP-A em células Huh 7.5 e Huh 7.5 SGR-JFH1, expostas por 24 horas a 15µM de CL/PP livre (barra azul e azul e azul listrado respectivamente), CL/PP Nano (barra rosa e rosa listrado, respectivamente) e nano branca (barra verde e verde listrado). O controle negativo, tanto da Huh 7.5 quanto da Huh 7.5 SGR-JFH1, foi exposto apenas ao meio de cultura (barra roxa e roxa listrada, respectivamente), o GAPDH foi utilizado como controle interno (barra salmão). Barras com letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos. ANOVA e teste de Bonferroni foram usados ($P < 0,05$). Os dados estão apresentados como média e erro padrão de média (barras).

4.9 Apoptose e Necrose

Os processos de morte celular podem ser classificados em apoptose inicial (AI), apoptose tardia (AT) e necrose (N). Estes eventos são discernidos com base na etapa das alterações morfológicas, como a diminuição celular, a picnose e o surgimento de corpos apoptóticos no processo de apoptose. Enquanto a necrose apresenta rupturas de membranas, juntamente com o aumento da célula e do núcleo (Shin *et al.*, 2015).

A membrana plasmática é constituída por membranas externa e internas, composta por lipídios assimetricamente distribuídos. A fosfatidilserina é um fosfolipídio localizado na interface interna da membrana de células íntegras. Contudo, durante o processo de apoptose este fosfolipídio é exposto ao ambiente extracelular, estando acessível à ligação com a anexina V conjugada a FITC, com emissão de fluorescência verde (Crowley *et al.*, 2016).

O PI só é capaz de penetrar as células em estado de necrose, pois estão permeáveis devido a integridade da membrana já comprometida. O PI intercala-se ao DNA, indicando o processo necrótico a partir da emissão de fluorescência vermelha (Rieger *et al.*, 2011).

A Figura 18 demonstra que o tratamento com a nanoemulsão branca não induziu o processo de apoptose e necrose, não apresentando diferenças significativas com o controle negativo. Enquanto que, a CL/PP livre e CL/PP nano da Huh 7.5 apresentaram uma viabilidade de aproximadamente 60%, estando distante dos valores do controle positivo, mas ainda assim, apresentaram uma taxa de células viáveis (CV) relativamente baixa.

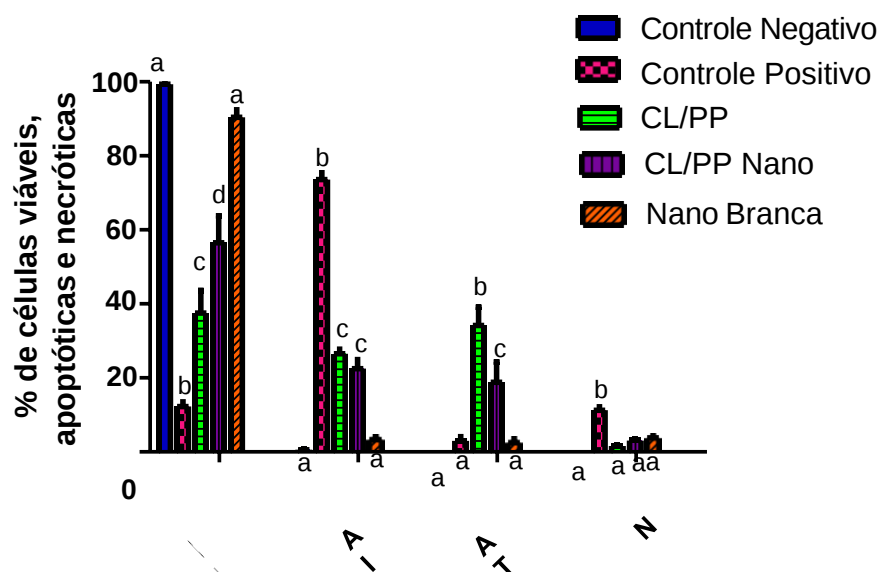
Vale lembrar que a CL e PP, entre diversas propriedades terapêuticas, destacam-se seus efeitos antitumorais e a Huh 7.5, sendo uma célula de hepatocarcinoma, pode não sair ilesa a esses efeitos.

Estudos revelam que a curcumina induz a apoptose e a autofagia de células de câncer de mama (Choudhuri *et al.*, 2002). Enquanto que a piperina demonstrou induzir apoptose em células de melanoma (Aoki *et al.*, 2007) e a morte celular autofágica em células de câncer de próstata (Fofaria; Kim; Srivastava, 2014). A associação de curcumina e piperina induz a autofagia e apoptose nas células de leucemia (Lowe; Lin, 2000; Mathew; Karantza-Wadsworth; White, 2007; Li *et al.* 2020).

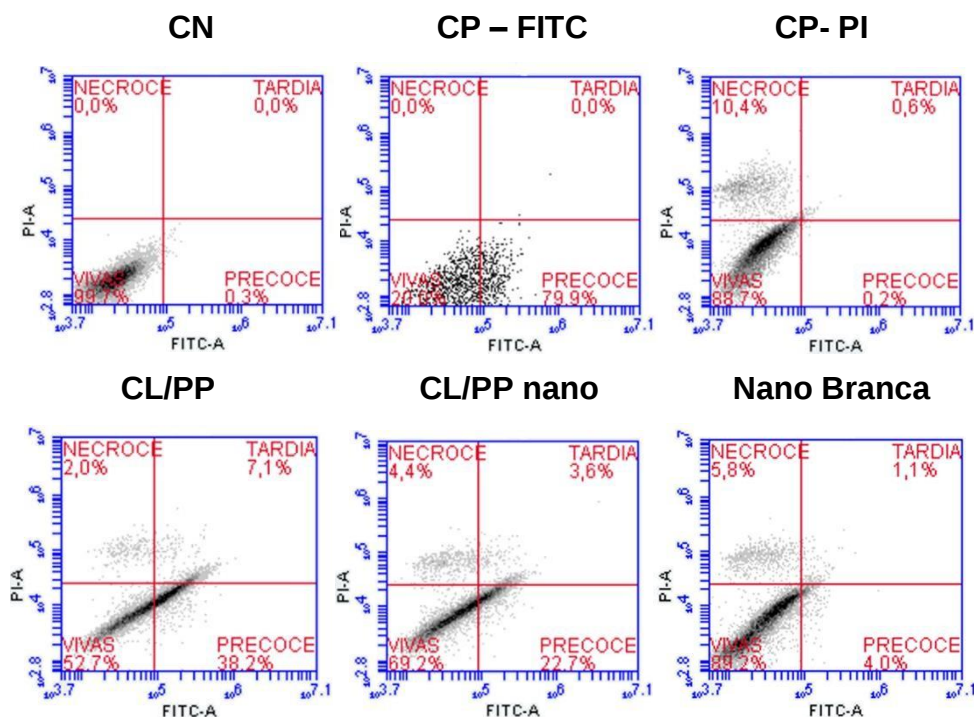
Além disso, foi relatado o efeito destes compostos no ciclo celular, a CL/PP induz a estagnação do ciclo celular em células cancerígenas, ambos os compostos causam um aumento de células na fase S (Aoki *et al.*, 2007; Fofaria; Kim; Srivastava, 2014; Li, *et al.*, 2020). Shiu e colaboradores (2013) demonstraram a capacidade da CL em provocar a apoptose e inibir a viabilidade celular em células Huh-7, de forma proporcional à dose administrada, o que explicaria o fato dos níveis de apoptose apresentados na Figura 13 não serem maiores. Afinal, foi selecionada neste trabalho, através do ensaio de MTT e VN, uma baixa concentração de CL/PP, próxima ao IC₂₀, pois o objetivo é encontrar uma concentração segura para a Huh 7.5 mas que tenha efeito sobre a infecção do HCV em células SGR-JFH1.

Figura 18: Análise por citometria de fluxo de eventos de apoptose em células Huh 7.5.

A



B



Fonte:Elaborado pela autora.

Legenda: Análise por citometria de fluxo de eventos de apoptose em células Huh 7.5 após 24 h de exposição a CL/PP, CL/PP nano e nano branca (15 μ m), meio não citotóxico D-MEM (controle negativo) e peróxido de hidrogênio (controle positivo). (a) Comparação dos eventos. (b) Gráfico de pontos de citometria de fluxo representativo de dados derivados de FITC-anexina V e iodeto de propídio incorporado (PI). Barras com letras diferentes em cada evento representam diferenças significativas entre os grupos. A população de células viáveis (anexina V-/PI-), apoptóticas (anexina V+/PI-) e necróticas (anexina V+/PI+)/(anexina V-/PI+) estão representadas nas células inferior esquerda, inferior direita, superior esquerda e quadrantes superiores direitos, respectivamente. ANOVA e teste de Bonferroni foram usados ($P < 0,05$). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (barras).

Na figura 19 podemos observar que a reação da nanoemulsão branca nas células SGR-JFH1 gerou o maior índice de viabilidade depois do controle negativo, diferentemente da Huh 7.5, o qual a nano branca não apresentou diferenças significativas quando comparada com o mesmo controle. Tal resultado é muito interessante de se observar, pois ao levar em consideração as características do HCV, havia a suspeita que o resultado não apresentaria diferença significativa com o controle negativo, assim como foi observado nas células Huh 7.5.

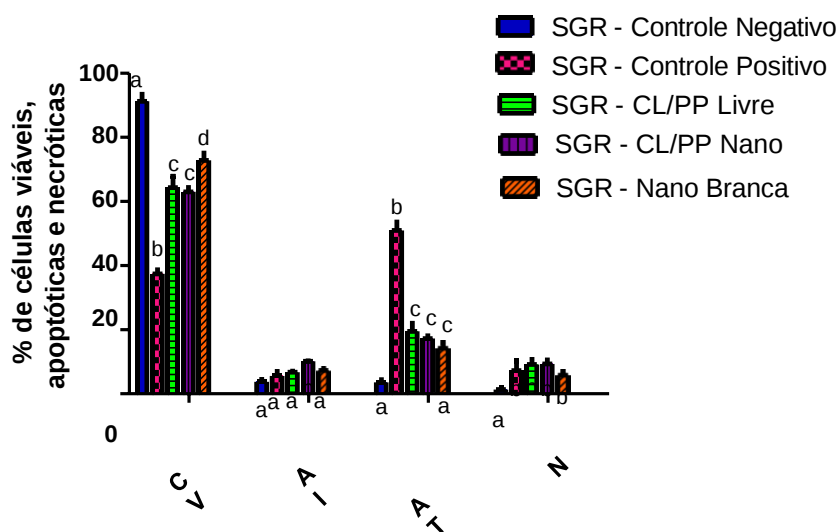
Porém, a viabilidade da SGR-JFH1 caiu em comparação com a Huh 7.5, estando por volta de 70%, infelizmente não há na literatura sobre o efeito de nanoemulsões na viabilidade celular de SGR-JFH1. Contudo, com base nos nossos resultados, é possível que o aumento dos níveis de apoptose esteja relacionado ao aumento da carga viral, consequência do tratamento da nano branca, já relatada neste trabalho.

Outra diferença da SGR-JFH1 com os resultados da Huh 7.5 é que os tratamentos da CL/PP livre e da CL/PP nano não apresentaram diferenças significativas, além disso, a SGR-JFH1 apresentou um índice de células viáveis ligeiramente maior no tratamento com CL/PP livre e nano (aproximadamente 60%) do que a Huh 7.5. Ou seja, os tratamentos afetaram tanto as células infectadas quanto as não infectadas, em outras palavras houve um aumento da apoptose em ambas as linhagens quando comparadas com os controles negativos.

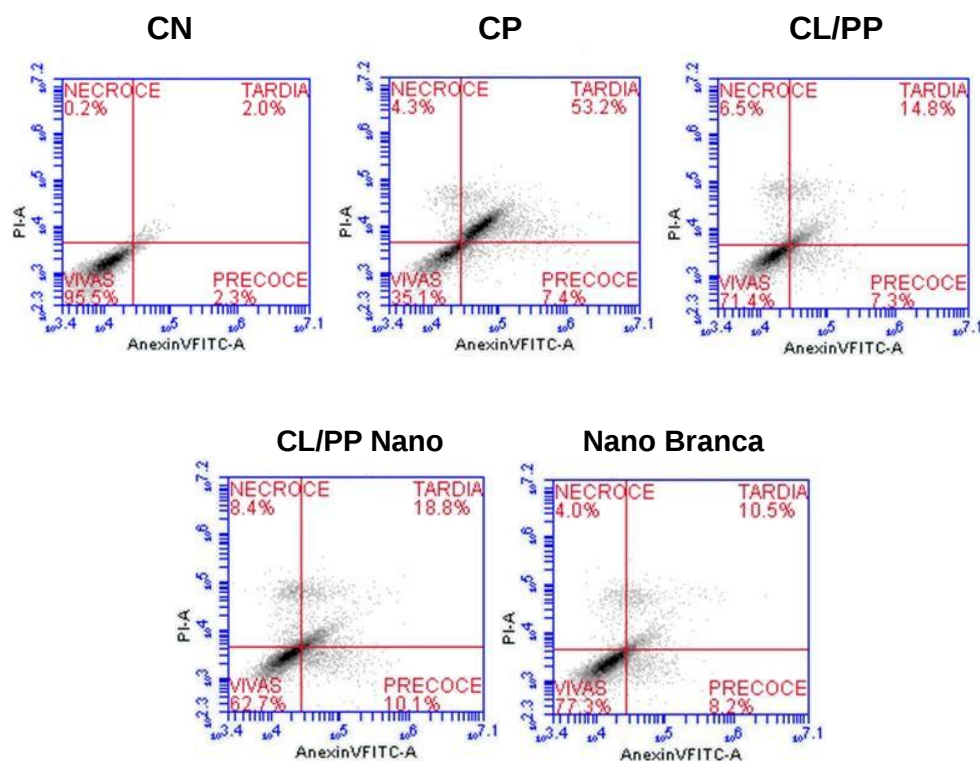
Porém, a SGR-JFH1 não apresentou níveis maiores de apoptose quando comparada à Huh 7.5, pelo contrário, o tratamento com a CL/PP livre apresentou uma viabilidade maior em células SGR-JFH1. Tais resultados podem ser atribuídos às características anti-apoptóticas do vírus, principalmente ao se levar em conta que a NS5A é a principal responsável pela sobrevivência de hepatócitos infectados pelo HCV e esta, aparentemente, não se afetou com os tratamentos de compostos CL/PP, favorecendo a resistência ao processo de apoptose da SGR-JFH1. Trabalhos com lipossomas de curcumina também chegaram a essa conclusão, demonstrando que o composto não foi citotóxico às células transfectadas com o replicon subgenômico do vírus, demonstrando que a ação anti-HCV dos compostos age por outras vias que não inclui a via apoptótica (Yusuf, 2022).

Figura 19: Análise por citometria de fluxo de eventos de apoptose em células Huh 7.5 SGR.

A



B



Fonte:Elaborado pela autora.

Legenda: Análise por citometria de fluxo de eventos de apoptose em células Huh 7.5 SGR após 24 h de exposição a CL/PP, CL/PP nano e nano branca (15 µm), meio não citotóxico D-MEM (controle negativo) e peróxido de hidrogênio (controle positivo). (a) Comparação dos eventos. (b) Gráfico de pontos de citometria de fluxo representativo de dados derivados de FITC-anexina V e iodeto de propídio incorporado (PI). Barras com letras diferentes em cada evento representam diferenças significativas entre os grupos. A população de células viáveis (anexina V-/PI -), apoptóticas (anexina V+/PI -) e necróticas (anexina V+/PI+)/(anexina V-/PI+) estão representadas nas células inferior esquerda, inferior direita, superior esquerda e quadrantes superiores direitos, respectivamente. ANOVA e teste de Bonferroni foram usados ($P < 0,05$). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (barras).

Estes resultados são realmente promissores, pois ao analisá-los em conjunto com os resultados da carga viral por *q*PCR podemos concluir que os tratamentos de CL/PP livre e CL/PP nano estão diminuindo a carga viral nas células SGR-JFH1, sem aumentar os níveis de apoptose. Ou seja, ao imaginarmos este efeito no tecido hepático, isto significa que existe a possibilidade destes compostos combaterem o vírus sem causar maiores danos ao fígado como, por exemplo, provocando o aumento da fibrose hepática.

5. Conclusões

Foi examinado os mecanismos pelos quais a combinação de curcumina e piperina influencia diferentes vias metabólicas em células de hepatocarcinoma infectadas e não infectadas com o vírus do HCV. Dessa forma, conclui-se que a nano branca e os CNBs geram efeitos na Huh 7.5 e na replicação do HCV em células SGR-JFH1. Sendo assim, através deste trabalho, podemos concluir:

- As nanoemulsões foram sintetizadas com êxito, apresentando um bom índice de polidispersividade e ótima eficiência na entrega dos compostos naturais, com um percentual de internalização superior a 30%.
- A nanoemulsão também apresentou baixa citotoxicidade, com um IC_{50} superior quando comparado aos CNBs, demonstrando ser um excelente carreador.
- Não foi detectado bandas das proteínas HIF-1 α , p62 e NF-k β em nenhuma condição, inclusive nos controles negativos, impossibilitando maiores análises sobre estas vias no presente estudo. A NS5A, em contrapartida, foi detectável em todos os tratamentos e no controle negativo das células SGR-JFH1, excetuando, obviamente, a coluna referente a Huh 7.5, pois se trata de uma proteína viral. Dessa forma, a partir de uma análise preliminar destes resultados, não foi identificado efeito de nenhum tratamento sobre a proteína NS5A.
- Referente a carga viral intracelular, a CL/PP livre e a CL/PP nano demonstraram possuir um ótimo potencial na inibição da carga viral, com uma diminuição superior a 2000 vezes, não apresentando diferenças significativas entre si. Contudo, a nano branca induziu o aumento da carga viral em mais de 300 vezes em comparação ao controle negativo. Entretanto, com relação ao sobrenadante, os tratamentos com CL/PP livre e CL/PP nano não foram significativamente distintas do controle negativo, enquanto o

tratamento com a nano branca demonstrou um significativo aumento da carga viral no meio extracelular.

- No que concerne os níveis de expressão da SMADS 6 houve um aumento significativo nos tratamentos com a nano branca em ambas as linhagens, enquanto que o tratamento com CL/PP nano diminuiu de forma expressiva os níveis de smad 6 nos hepatócitos infectados e não infectados. Contudo, o tratamento com CL/PP livre aumentou os níveis de expressão da smad 6 nas células SGR-JFH1 e diminuiu com a CL/PP nano. Já com as células Huh 7.5, tanto o tratamento com a CL/PP livre quanto com a CL/PP nano, foi observado menores níveis de expressão da smad 6, não havendo diferenças significativas neste caso.
- Os níveis de expressão de SMAD 7 e VAP-A não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos quando comparadas ao controle negativo, exceto o tratamento com CL/PP livre em células SGR-JFH1, com aumentos de 5,18 e 4,19 vezes, respectivamente, quando comparados com o controle interno.
- A nano branca não induziu a apoptose em células Huh 7.5 e SGR-JFH1, apresentando, aproximadamente, 90 e 77% de células viáveis, respectivamente.
- Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com CL/PP livre e CL/PP nano na viabilidade das células SGR-JFH1 pela análise de apoptose e necrose, aproximadamente 60%, apresentando maior resistência aos compostos que a célula Huh 7.5.

Os resultados obtidos são extremamente otimistas ao concluir que tanto os CNBs livres quanto os CNBs nanoemulsionados apresentam potencial terapêutico no tratamento de hepatite C, reduzindo consideravelmente a carga viral do HCV sem elevar os níveis de apoptose, o que possibilita a sua

associação adjuvante aos tratamentos já estabelecidos. O fato de não haver vantagem no uso dos compostos nanoemulsionados, pois não apresentaram maior eficácia que os CNBs sem nanoemulsão, é extremamente positivo, pois significa que não há necessidade de técnicas mais sofisticadas para potencializar a eficácia destes compostos. Isto contribui para que o tratamento tenha um custo-benefício mais acessível, além de simplificar a sua utilização, pois a via de administração permanece oral, o que possibilita aos pacientes incluir estes compostos à sua dieta.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAKEEM, M.; SHOUKRY, N. Protective immunity Against hepatitis C: many shades of gray. **Frontiers in Immunology**. v. 5, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00274.

ABDELHAMID, A.; SELIM, A.; ZAAFAN, M. The Hepatoprotective Effect of Piperine Against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Mice: The Involvement of miR-17 and TGF- β /Smads Pathways. **Front Mol Biosci**, v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fmolb.2021.754098.

ABU-HAMAD, S. *et al.* Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. **J. Biol. Chem**, v. 283, p. 13482–13490, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M708216200.

ACHLEITNER, G. *et al.* Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. **Eur. J. Biochem**, v. 264, p. 545–553, 1999. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00658.x.

ALTINEL, Y. *et al.* The efficacy of curcumin on PDGF expression and NF-kappa B pathway: TNBS-induced colitis. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg**, v. 5, p. 663-670, 2020. DOI: 10.14744/tjtes.2019.45570.

AMAKO, Y. *et al.* Role of oxysterol binding protein in hepatitis C Virus infection. **J. Virol**, v. 83, p. 9237–9246, 2009. DOI: 10.1128/JVI.00958-09.

ANDRADE, M. Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultrastruturais de microcistinas em células Vero. **Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**, Portugal, Porto, p.1 – 7, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/152281>.

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. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304299.

AOKI, H. *et al.* Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas invitro and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal- regulated kinase signaling pathways. **Mol Pharmacol**. v. 72, p. 29-39, 2007. DOI: 10.1124/mol.106.033167.

ASHRAFI, G.; SCHWARZ, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. **Cell Death Differ**, v. 20, p. 31-42, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>.

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. DOI: 10.3390/ijms18040332

ATAL, N.; BEDI, K. Bioenhancers: Revolutionary concept to market. **J. Ayurveda Integr. Med.** v.1, p. 96–99, 2010. DOI: 10.4103/0975-9476.65073.

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. DOI: 10.4103/0974-8490.171096.

AVILA-CARRASCO, L. *et al.* Natural Plants Compounds as Modulators of Epithelial-to- Mesenchymal Transition. **Front. Pharmacol**, v. 10, p. 1-24, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00715.

AVULA, K. *et al.* Role of Lipid Transfer Proteins (LTPs) in the Viral Life Cycle. **FrontMicrobiol**, v.12. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.673509.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to invitro toxicology. **ATLA**, v. 18, p. 129 – 44, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1177/026119299001800116.1>.

BAHRAMI, A. *et al.* Effects of curcumin on hypoxia-inducible factor as a new therapeutic target. **Pharmacological Research**. 2018. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.10.009

BARBARO, G. *et al.* Hepatocellular mitochondrial changes in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical finding. **J. Gastroenterol**, v. 94, p. 2198–2205, 1999. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01294.x.

BARMAN, B. *et al.* VAP-A and its binding partner CERT drive biogenesis of RNA- containing extracellular vesicles at ER membrane contact sites. **Developmental Cell**, v.57, p. 974-994, 2022. DOI: 10.1016/j.devcel.2022.03.012

BARTENSCHLAGER, R.; COSSET, F.; LOHMANN, V. Hepatitis C virus replication cycle. **Journal of Hepatology**, v.53, p. 583-585, 2010. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.04.015.

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, p.482-496, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro3046.

BEAUMONT, E. *et al.* Mixing particles from various HCV genotypes increases the HBV-HCV vaccine ability to elicit broadly cross-neutralizing antibodies. **Liver Int.** v 40, p. 1865-1871, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.14541>

BECHMANN, L. *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **J Hepatol**, v. 56, p. 952-964, 2012. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.08.025

BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**. v. 5, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>.

BENAYAD, S. *et al.*, The Promise of Piperine in Cancer Chemoprevention. **Cancers**, v.22, p. 1-18, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15225488>.

BERGER, K. *et al.* Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha in hepatitis C virus replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 106, p. 7577– 7582, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0902693106. DOI: 10.1073/pnas.0902693106.

BI SHAIKH, S.; BHAT, S. G.; BHANDARY, Y. P. Curcumin attenuates IL-17A mediated pulmonary SMAD dependent and non-dependent mechanism during acute lung injury in vivo. **Mol Biol Rep.**, v. 7, p. 5643-5649, 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05587.

BONFIM, C.M. *et al.* Antiviral activity of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in vulvar cell lines transducing different variants of HPV-16. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v. 48, p. 515-524, 2020. DOI: 10.1080/21691401.2020.1725023.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais no Brasil. Brasília: **Secretária de Vigilância em Saúde** - Ministério da Saúde, v.48, n.24, p.17- 18, 2017. Disponível em: <https://central3.to.gov.br/arquivo/387533/>. Acesso em: 15 dez. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Técnica N°30/2023-CGAHV/.DVIAHV/SVSA/MS. 1(ed). Brasília: **Ministério da Saúde**, 2023. Disponível em: <https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agrivos/Hepatite%20C/Publica%C3%A7%C3%B5es/NT30-2023-HepatiteC.pdf>. Acesso em 12 jul. 2024.

BRUICK, R. K.; MCKNIGHT, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science**, v. 294, p. 1337–1340, 2001. DOI: 10.1126/science.1066373.

BURCHELL, V. S. *et al.* The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. **Nat. Neurosci.** v. 16, p.1257–1265, 2013. DOI: 10.1038/nn.3489

BURTON, P. *et al.* Predicting drug absorption: How nature made it a difficult problem. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, p. 889–895, 2002. DOI: 10.1124/jpet.102.035006.

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. DOI: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742014000400011>.

CERNY, A.; CHISARI, V. Immunological aspects of HCV infection. **Intervirology**, v 37., p 119-15, 1994. DOI: 10.1159/000150366

CERPNJAK, K. *et al.* Lipid-based systems as promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Acta Pharmaceutica**, n. 4, v. 63, p. 427-445, 2013. DOI: 10.2478/acph-2013-0040.

CHAYAMA, K.; HAYES, C. N. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, p. 83–95, 2011. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06550.x

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. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1096.

CHENG, D.; *et al.* Hepatitis C virus NS5A drives a PTEN-PI3K/Akt feedback loop to support cell survival. **Liver International**, v. 35, p.1682–1691, 2015. DOI: 10.1111/liv.12733.

CHENG, D. *et al.* p53 controls non-structural hepatitis C virus 5A-mediated down-regulation of GADD45α expression via NF-κB and PI3K-Akt pathways. **J. Gen. Virol**, v. 94, p. 326–335, 2013. DOI: 10.1099/vir.0.046052-0.

CHEVALIEZ, S.; PAWLITSKY, J. M. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World J Gastroenterol**, v. 13, p. 2461–2466, 2007. DOI: 10.3748/wjg.v13.i17.2461.

CHIAPPARINO, A. *et al.* The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. **Prog. Lipid Res**, v. 61, p. 30–39, 2016. DOI: 10.1016/j.plipres.2015.10.004.

CHOUDHURI, T. *et al.* Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. **FEBS Lett**, v. 512, p. 334-340, 2002. DOI:10.1016/s0014-5793(02)02292-5.

CHUNG, M. *et al.* Niche-mediated BMP/SMAD signaling regulates lung alveolar stem cell proliferation and differentiation. **Development**, v. 145, 2018. DOI: 10.1242/dev.163014.

CONNER, S.; SCHMID, S. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37–44, 2003. DOI: 10.1038/nature01451.

CROWLEY, L. C. *et al.* Dead cert: measuring cell death. **Cold Spring Harb. Protoc.**, n.12, p. 1064–1072, 2016. DOI: 10.1101/pdb.top070318.

CRUZ, C.; SHIRASSU, M.; MARTINS, W. Comparison between hepatitis B and C epidemiological profiles at a public institution in São Paulo, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 3, p. 225-229, 2009. DOI: 10.1590/s0004-28032009000300016.

CSORDÁS, G. *et al.* Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. **J. Cell Biol**, v. 174, p. 915–921, 2006. DOI: 10.1083/jcb.200604016.

CUYPERS, L. *et al.*, Genetic diversity and selective pressure in hepatitis C virus genotypes 1-6: significance for direct-acting antiviral treatment and drug resistance. **Viruses**, v. 7, p. 5018-5039, 2015. DOI: 10.3390/v7092857.

DAS, K.; NOZAKI, T. Non-vesicular Lipid Transport Machinery in *Entamoeba histolytica*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, p. 1-14, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00315.

D'ANGELO, G. *et al.* Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. **Nature**, v. 449, p. 62–67, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06097>.

D'ANGELO, G. *et al.* Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. **Nature**, v. 501, p. 116–120, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12423>.

DENTON, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1787, p. 1309–1316, 2009. DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.01.005.

DE OCA-ÁVALOS, J. *et al.* Nanoemulsions: stability and physical properties. **Curr Opin Food Sci**, v. 16, p. 1–6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.003>.

DÉRY, M. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1: regulation of hypoxic and non-hypoxic activators. **Int. J. Biochem. Cell. Biol**, v. 37, p. 535–540, 2005. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.08.012.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**, v. 425, p. 577–584, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02006>.

DEWIDAR, B. *et al.* TGF-β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated. **Cells**, v. 8, 2019. DOI: 10.3390/cells8111419.

DOMINGO, E.; PERALES, C. Viral quasispecies. **Plos Genetics**, v.15, 2019. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008271.

DUBUISSON, J.; COSSET, F. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. **J Hepatol**, v. 61, p. 3-13, 2014. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.

DUVERLIE, G. et al. Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J Gen Virol*, v. 79, p. 1373-1381, 1998. DOI: 10.1099/0022-1317-79-6-1373.

DZIERAN, J. et al. Comparative Analysis of TGF- β /Smad Signaling Dependent Cytostasis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Plos One*, v. 8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0072252.

ELBAZ, Y.; SCHULDINER, M. Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Trends Biochem. Sci*, v. 36, p. 616–623, 2011. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.08.004.

EL-SHAMY, A.; HOTTA, H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: an overview. *World J Gastroenterol*. v. 20, p.7555–7569, 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7555.

ENOMOTO, N. et al. Mutations in the nonstructural protein 5a gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*, v. 334, p.77-82, 1996. DOI: 10.1056/NEJM199601113340203.

EVANS, M.; RICE, C.; GOFF, S. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, p. 13038-13043, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0405152101

EYRE, N. S. et al. Dynamic Imaging of the Hepatitis C Virus NS5A Protein during a Productive Infection. *Journal of Virology*, v. 88, n.7, 2014. DOI: 10.1128/JVI.02490-13.

FARCI, P.; BUKH, J.; PURCELL, R. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin Immunopathol*, v. 19, p. 5-26, 1997. DOI: 10.1007/BF00945022.

FELD, J. et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *The New England Journal of Medicine*, n. 27, v. 373, 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1512610.

FELMLEE, D. et al. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses*, v.5, p. 1292-1324, 2013. DOI: 10.3390/v5051292.

FEINSTONE, M. et al., Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, v.292. p. 767-770, 1975. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197504102921502>.

FERNANDES, M. A. et al. Reversed-Phase HPLC: A Fast and Efficient Analytical Method to Quantify Docetaxelloaded Pegylated Liposomes in Release Study. *J. Sep. Sci*, v. 21, p. 3986-3995, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202100382>.

FOFARIA, N. M.; KIM, S. H.; SRIVASTAVA, S. K. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. *Plos One*, v.9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0094298.

FONSECA, L. M. et al. Piperine Inhibits TGF- β Signaling Pathways and Disrupts EMT-Related Events in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Medicine*, v. 4, 2020. DOI: 10.3390/medicines7040019.

FOROUZANFAR, F. et al. Neuroprotective effects of curcumin through autophagy modulation. *Wiley IUBMP Life*, v. 72, p. 652-664, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.2209>.
 FREHA, N. A. et al. Chronic hepatitis C: Diagnosis and treatment made easy. *Eur J Gen Pract*, v. 28, p. 102-108, 2022. DOI: [10.1080/13814788.2022.2056161](https://doi.org/10.1080/13814788.2022.2056161).

GACHPAZAN, M. et al. Targeting Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathway by Curcumin: Implications for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol*, v. 1291, p. 41-53, 2021. DOI: [10.1007/978-3-030-56153-6_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-56153-6_3).

GANE, E. et al. The emergence of NS5B resistance associated substitution S282T after sofosbuvir-based treatment. *Hepatol Commun.*, p. 538–549, 2017. DOI: [10.1002/hep4.1060](https://doi.org/10.1002/hep4.1060).

GEISLER, S. et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, v.12, p.119–13, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb2012>.

GHAH, R. et al. ORP5 and ORP8 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P (2)) and regulate its level at the plasma membrane. *Nat. Commun*, v. 8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00861-5>.

GEROLD, G.; RICE, C. Locking out hepatitis C. *Nature Medicine*. v.17, p. 542-544, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm0511-542>.

GEROLD, G.; PIETSCHMANN, T. The HCV life cycle: in vitro tissue culture systems and therapeutic targets. *Dig Dis*, v. 32, p. 525-537, 2014. DOI: [10.1159/000360830](https://doi.org/10.1159/000360830).

GIBAUD, S.; ATTIVI, D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. *Expert Opin Drug Deliv*, v.8, p. 937-951, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.694865>.

GIORGI, C. et al. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v. 41, p. 1817–1827, 2009. DOI: [10.1016/j.biocel.2009.04.010](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.010).

GIVAN, A. L. *Em Flow Cytometry: An Introduction*; Hawley, T. S.; Hawley, R. G. Humana Press: New York, cap. 1, 2004.

GLESNE, D.; HUBERMAN, E. Smad6 is a protein kinase X phosphorylation substrate and is required for HL-60 cell differentiation. *Oncogene*, v, 25, p. 4086–4098, 2006. DOI: [10.1038/sj.onc.1209436](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209436).

GONÇALVES, A. et al. Production, properties, and applications of solid self-emulsifying delivery systems (S-SEDS) in the food and pharmaceutical industries. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, v. 538, p.108–126, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.076>.

GONG, G. et al. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 98, p. 9599–9604, 2001. DOI: [10.1073/pnas.171311298](https://doi.org/10.1073/pnas.171311298).

GOUDA, M.; PRABHU, A.; BHANDARY, Y. IL-17A suppresses and curcumin up- regulates Akt expression upon bleomycin exposure. *MolBiol Rep*, v. 45, p. 645–650, 2018. DOI: [10.1007/s11033-018-4199-3](https://doi.org/10.1007/s11033-018-4199-3).

GOUMANS, M. et al. Bone morphogenetic proteins in vascular homeostasis and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, v.2, p. 1-32, 2018. DOI: [10.1101/cshperspect.a031989](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031989).

GÖTTE, M.; FELD, J. Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 6, p. 338-351, 2016. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.60.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, v. 61, p. 45–57, 2014. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.

GUNGOR, M. Z.; UYSAL, M.; SENTURK, S. The Bright and the Dark Side of TGF- β Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Mechanisms, Dysregulation, and Therapeutic Implications. *Cancers*, v. 4, p. 1-36, 2022. DOI: 10.3390/cancers14040940.

GUO, X.; WANG, X. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Research*, v. 19, p. 71-88, 2009. DOI: 10.1038/cr.2008.302.

GUODONG, X.; XIU, X.; CONGYI, Z. GPS2 Is Required for the Association of NS5A with VAP-A and Hepatitis C Virus Replication. *Plos One*, v. 8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0078195.

GUPTA, S.; PATCHVA S.; AGGARWAL, B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J*, v. 15, p. 195–218, 2013. DOI: 10.1208/s12248-012-9432-8.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, v.13, p. 245–251, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.005>.

GUSTAFSON, B. et al. BMP4 and BMP antagonists regulate human white and beige adipogenesis. *Diabetes*, v.64, p. 1670–1681, 2015. DOI: 10.2337/db14-1127.

HADDADZADEGAN, S.; DORKOOSH, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 182, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114097>.

HAN, J. et al. Piperine: Chemistry and Biology. *Toxins*, v. 12, p. 1-20, 2023. DOI: 10.3390/toxins15120696.

HANADA, K. Lipid transfer proteins rectify inter-organelle flux and accurately deliver lipids at membrane contact sites. *J. Lipid Res*, v. 59, p. 1341–1366, 2018. DOI: 10.1194/jlr.R085324.

HANADA, K. et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*, v. 426, p. 803–809, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02188>.

HARDIE, D. G. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog. Lipid Res*, v. 28, p. 117–146, 1989. DOI: 10.1016/0163-7827(89)90010-6.

HAYASHI, H. et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell*, v. 89, p.1165–1173, 1997. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80303-7.

HAYES, N.; IMAMURA, M.; CHAYAMA, K. Management of HCV patients in cases of direct-acting antiviral failure. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, v.9, p. 839-848, 2019. DOI: 10.1080/17474124.2019.1651642.

HEIDARI, H. et al. Curcumin-piperine co-supplementation and human health: A comprehensive review of preclinical and clinical studies. *Phytother Res*, v. 4, p. 1462- 1487, 2023. DOI: 10.1002/ptr.7737.

HELLE, J. et al. Organization and function of membrane contact sites. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1833, p. 2526–2541, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.028>.

HERBST, D. JR.; REDDY, K. R. Sofosbuvir, a nucleotide polymerase inhibitor, for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 22, p. 527–536, 2013. DOI: 10.1517/13543784.2013.775246.

HIGASHI, K. et al. Characterization of hypervariable region in hepatitis C virus envelope protein during acute and chronic infection. *Arch Virol*, v 150, p. 883-98, 2005. DOI: 10.1007/s00705-004-0470-0.

HOLOUBEK, J. Some applications of light scattering in materials science. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, v. 106, n. 1-3, p. 104-121, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2007.01.013>.

HONG, S. et al. Smad7 protein induces interferon regulatory factor 1-dependent transcriptional activation of caspase 8 to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, v. 288, p. 3560– 3570, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.400408.

HU, F. et al. Smad ubiquitylation regulatory factor 1 promotes LIM-homeobox gene 9 degradation and represses testosterone production in Leydig cells. *The FASEB Journal*, v. 32, p. 4627-4640, 2018. DOI: 10.1096/fj.201701480R.

HU, J. et al. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 30, p. 233–245, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1081/DDC-120030422>.

HUANG, B. L. et al. Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase — DNA- derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J. Biol. Chem*, v. 273, p. 17680–17688, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.28.17680.

IBUKI, Y.; TOYOOKA, T. *Em Nanoparticle Uptake Measured by Flow Cytometry*; Reineke, J. (ed.) Humana Press: New York, cap. 11, 2012. DOI: 10.1007/978-1- 62703-002-1_11.

IMAMURA, T. et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, v. 389, p. 622–626, 1997. DOI: 10.1038/39355.

INCHAUSPE, G.; PRINCE, A. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, p.10292–10296, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.22.10292.

IRSHAD, M. et al. Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. *World J. Hepatol.*, v. 9, n. 36, p. 1305-1314, 2017. Disponível em: <http://wjgnet.com/doi:10.4254/wjh.v9.i36.1305>. Acesso em: 27 dez. 2022. DOI: 10.4254/wjh.v9.i36.1305.

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: 23 dez. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.018>.

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. *Journal of Virology*, n. 6, v. 90, 2016. DOI: 10.1128/JVI.02976-15.

JIANG, F. et al. Regulating macrophage-MSC interaction to optimize BMP-2-induced osteogenesis in the local microenvironment. *Bioactive Materials*, v.25, p. 307-318, 2023. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.02.001.

JIN, Z. et al. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 151, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113092.

JUNG, S. M. et al. Smad6 inhibits non-canonical TGF- β 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nature Communications*, n. 2562, p. 1-16, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms3562>.

JUNYU, F. et al. Curcumin mitigates the epithelial-to-mesenchymal transition in biliary epithelial cells through upregulating CD109 expression. *Drug Development Research*, v. 80, p. 992-999, 2019. DOI: 10.1002/ddr.21580

KARDASHIAN, A.; POCKROS, P. Novel emerging treatments for hepatitis C infection: a fast-moving pipeline. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 10, p. 277-282, 2017. DOI: 10.1177/1756283X16683875.

KARTHIK, P. et al. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 57, p.1435–1450, 2017. DOI: 10.1080/10408398.2015.1006767.

JASSEY, A. et al. Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 5A (NS5A) Disrupts Mitochondrial Dynamics and Induces Mitophagy. *Cells*, v. 8, 2019. DOI: 10.3390/cells8040290.

KATO, N. et al. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol*, v 7, p. 3923-30, 1993. DOI: 10.1128/JVI.67.7.3923-3930.1993.

KANDA, T. et al. Daclatasvir plus asunaprevir treatment for real-world HCV genotype 1-infected patients in Japan. *Int J Med Sci*, v. 13, p.418–423, 2016. DOI: 10.7150/ijms.15519.

KANDANGWA, M.; LIU, Q. HCV NS5A hyperphosphorylation is involved in viral translation modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 192-197, 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.09.105.

KIM, C.; CHANG K. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol*, v.19, p. 15-25, 2013. DOI: 10.3350/cmh.2013.19.1.17

KIM, J. B. Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *J. Biol. Chem*, v. 279, p. 51999–52006, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M405522200.

KIM, K. H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu. Rev. Nutr*, v. 17, p. 77–99, 1997. DOI: 10.1146/annurev.nutr.17.1.77.

KIM, S. et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.111, p. 6413–6418, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1321114111.

KLIONSKY, D. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, v. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, v. 15, p. 331–352, 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12189.

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. DOI: 10.1038/srep31695.

KOTHA, R.; LUTHRIA, D. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*, v. 16, p. 1-27, 2019. DOI: 10.3390/molecules24162930.

KRAFT, M. L. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Molecular Biology of the Cell*, v. 24, p. 2765–2768, 2013. DOI: 10.1091/mbc.E13-03-0165.

KUMAR, M. et al. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Prev Nutr Food Sci.*, v. 24, p. 225-234, 2019. DOI: 10.3746/pnf.2019.24.3.225.

KUMTHIP, K.; MANEEKARN, N. The role of HCV proteins on treatment outcomes. *Virology Journal*, v.217, p. 1-12, 2015. DOI: 10.1186/s12985-015-0450-x.

KUPFER, B. HCV Virology. In: Verlag MF, editor. *Hepatology - A clinical textbook*. (ed) 7, 2016.

KURIEN, B.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. *Methods*, v. 4, p. 283-93, 2006. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007.

LABONTÉ, P. et al., Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based sitedirected mutagenesis. *J Biol Chem*, v 277, p. 38838-46, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M20465720

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: 26 dez. 2023. DOI: 10.1038/aps.2011.209.

LAMARK, T.; SVENNING, S.; JOHANSEN, T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*, v. 61, p. 609–624, 2017. DOI: 10.1042/EBC20170035.

LAURINDO, L. F. et al. Phytochemicals and Regulation of NF- κ B in Inflammatory Bowel Diseases: An Overview of In Vitro and In Vivo Effects. *Metabolites*, v. 96, 2023. DOI: 10.3390/metabo13010096.

LEBIEDZINSKA, M. et al. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v. 41, p. 2009. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.02.017.

LE GUILLOU-GUILLEMETTE, H. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol*, v. 13, 2007. DOI: 10.3748/wjg.v13.i17.2416.

LEMASTERS, J. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Research*, v. 8, p.3–5, 2005. DOI: 10.1089/rej.2005.8.3.

- LE ROY, C.; WRANA J. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 6, p.112–126, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1571>.
- LEV, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v. 11, p. 739–750, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm2971>
- LI, J.; SONG, L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*, v. 46, p. 593-599, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2216/07-11.1>.
- LI, N. et al. Antiproliferative potential of piperine and curcumin in drugresistant human leukemia cancer cells are mediated via autophagy and apoptosis induction, S-phase cell cycle arrest and inhibition of cell invasion and migration. *JBUON*, v.25, p. 401-406, 2020.
- Li, S. N.; WU, J. F. TGF- β /SMAD signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 11, n. 41, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1552-y>.
- LI, Y. et al. Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. *American Journal of Pathology*, v. 168, p. 1107–1118, 2006. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050959.
- LIM, P. et al. Correlation between NS5A dimerization and hepatitis C virus replication, *J. Biol. Chem*, v. 287, v. 36, p. 30861–30873, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.376822.
- LINDENBACH, B.; RICE, C. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 688-700, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro3098.
- LIU, S. et al. Sphingomyelin synthase 1 regulates the epithelial-mesenchymal transition mediated by the TGF- β /Smad pathway in MDA-MB-231 cells. *Mol Med Rep*, v.19, p.1159–1167, 2019. DOI: 10.3892/mmr.2018.9722.
- LOHMANN, V. Hepatitis C virus RNA replication. In: Bartenschlager R, editor. *Hepat. C virus mol. virol. antivir. ther.*, vol. 369. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 167-98, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_7. Acesso: 15 jul 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_7.
- LONARDO, A. Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: An update on survival strategy of a successful pathogen. *World J Gastroenterol*, v. 20, 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7089.
- LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, v. 21, p.485-495, 2000. DOI: 10.1093/carcin/21.3.485.
- MACDONALD, A.; Harris, M. Vírus da hepatite C NS5A: Tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol*, v. 85, p. 2485–2502, 2004. DOI: 10.1099/vir.0.80204-0.
- MAEDA, K. et al. Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature*, v. 501, p. 257–261, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12430>.
- MANNNS, M. P. et al., Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>.

MARIANNEAU, P. et al. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol*, v. 71, p. 3244–3249, 1997. DOI: 10.1128/JVI.71.4.3244-3249.1997.

MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, v. 6, p. 597–641, 1990. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.

MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v. 67, p. 753–791, 1998. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.

MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*. v. 66, p. 3225–3229, 1992. DOI: 10.1128/JVI.66.5.3225-3229.1992.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-4230201100010002>.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Role of autophagy in câncer. *Nat Rev Cancer*, v.7, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2254>.

MCCLEMENTS, D. J. et al. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J Food Sci*, v. 72, p.109–124, 2007. DOI: 10.1111/j.1750- 3841.2007.00507.x.

MCPHEE, F. et al. High sustained virologic response to daclatasvir plus asunaprevir in elderly and cirrhotic patients with hepatitis c virus genotype 1b without baseline NS5A polymorphisms. *Adv Ther*, v. 32, p. 637–649, 2015. DOI: 10.1007/s12325-015-0221-5.

MENG-HAO, H. et al. Up-regulation of glycolipid transfer protein by bicyclol causes spontaneous restriction of hepatitis C virus replication. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 9, p. 769-781, 2019. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.01.013.

MENG, X. M. et al. TGF-β: the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, v. 12, p. 325–338, 2016. DOI: 10.1038/nrneph.2016.48.

MESMIN, B. A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell*, v. 155, p. 830–843, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.056.

MESSINA, J. P. et al., Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, v. 87, p. 61-77, 2015. DOI: 10.1002/hep.27259.

MIRYAN, M. et al. Curcumin and Piperine in COVID-19: A Promising Duo to the Rescue? *Adv Exp Med Biol*, p. 197-204, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-71697-4_16.

MITCHELL, H. et al. Ligand-dependent and -independent Transforming Growth Factor- β Receptor Recycling Regulated by Clathrin-mediated Endocytosis and Rab11. *Molecular Biology of the Cell*, v.15, p. 4166–4178, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0245>.

MOLE, D. R. et al. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*, v. 52, p. 43–47, 2001. DOI: 10.1080/15216540252774757.

MORADPOUR, D.; PENIN, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 369, p. 113-142, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-27340- 7_5.

MORALES, J. M.; FABRIZI, F. Hepatitis C and its impact on renal transplantation. *Nat Rev Nephrol*, v. 11, n. 3, p. 172–182, 2015. DOI: 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. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00054.

MOUCARI, R. et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*, v.134, p. 416- 423, 2008. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.010.

MURAKAMI, E. et al. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, p. 2105–2112, 2014. DOI: 10.1128/AAC.02068-13.

MURAKAMI, G. et al. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell*, v. 14, p. 2809–2817, 2003. DOI: 10.1091/mbc.E02-07-0441.

MURPHY, G. et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from Central Africa. *J Clin Microbiol*, v.53, p. 967-972, 2015. DOI: 10.1128/JCM.02831-14.

MUSSO, G.; CASSADER, M.; GAMBINO, R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov*, v.15, p. 249-274, 2016. DOI: 10.1038/nrd.2015.3.

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. DOI: 10.1111/1541-4337.12047.

NELSON, K. et al. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin: Miniperspective. *J. Med. Chem*, v. 60, p. 1620–1637, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.

NIREI, K. et al. Ventricular Tachycardia as a Complication of Ledipasvir and Sofosbuvir Treatment for HCV Infection. *Intern Med.*, v. 56, p. 787-790, 2017. DOI: 10.2169/internalmedicine.56.7948.

NOBBMANN, U. et al. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev*, v. 24, p. 117-128, 2007. DOI: 10.1080/02648725.2007.10648095.

NOBUYUKI, E. et al. Mutations in the nonstructural protein 5a gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*, v. 5, 1996. DOI: 10.1056/NEJM199601113340203.

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. DOI: 10.3855/jidc.1169.

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, p. 9237– 9246, 2009. DOI: 10.1074/jbc.M808773200. DOI: 10.1074/jbc.M808773200.

PENG, Q. et al. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) alleviates hepatic steatosis by increasing hepatic lipid turnover and inhibiting the mTORC1 signaling axis in hepatocytes. *Aging*, Albany, NY, v. 11, p.11520–11540, 2019. DOI: 10.18632/aging.102552.

- PERETTI, D. et al. Lipid transfer proteins and membrane contact sites in human cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* v. 7, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2019.00371.
- POOLE, R. Daclatasvir + asunaprevir: first global approval. *Drugs*, v. 74, p.1559–1571, 2014. DOI: 10.1007/s40265-014-0279-4.
- PRASAD, S. et al. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol. Adv.* v. 32, p. 1053–1064, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.004.
- PUGH, C. W. Modulation of the Hypoxic Response. *Adv. Exp. Med. Biol.* v. 903, p. 259–271, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4899-7678-9_18.
- PUIG-BASAGOITI, F. et al. Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol*, v. 86, p.1067-1075, 2005. DOI: 10.1099/vir.0.80526-0.
- QADIR, A. et al. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *J Mol Liq.* v.214, p. 7–18, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.050>.
- QIAO, L.; LUO, G. Functional Characterization of Apolipoproteins in the HCV Life Cycle. In: *Hepatitis C Virus Protocols. Methods in Molecular Biology*, v. 1911. New York, NY. Humana Press, 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-8976-8_16.
- RADMANIĆ, L. et al. Distinct Expression Patterns of Genes Coding for Biological Response Modifiers Involved in Inflammatory Responses and Development of Fibrosis in Chronic Hepatitis C: Upregulation of SMAD-6 and MMP-8 and Downregulation of CAV-1, CTGF, CEBPB, PLG, TIMP-3, MMP-1, ITGA-1, ITGA-2 and LOX. *Medicina*, v. 12, 2022. DOI: 10.3390/medicina58121734.
- RAY, C. et al. Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol*, v 73, p. 2938-46, 1999. DOI: 10.1128/JVI.73.4.2938-2946.1999.
- RAZANI, B. et al. Caveolin-1 Regulates Transforming Growth Factor (TGF)- β /SMAD Signaling through an Interaction with the TGF- β Type I Receptor. *J Biol Chem*, v. 276, p. 6727–6738, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M008340200.
- 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. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.04.067.
- REED, K.; XU, J.; RICE, C. Phosphorylation da proteína NS5A do vírus da hepatite C in vitro e in vivo: Properties of the NS5A-associated kinase. *J. Virol*, v. 71, p. 7187–7197, 1997. DOI: 10.1128/JVI.71.10.7187-7197.1997.
- REHMAN, A. et al. Biopolymer based nanoemulsion delivery system: An effective approach to boost the antioxidant potential of essential oil in food products. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 2, p. 1-16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100082>.
- REISS, S. et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe*, v. 9, p. 32–45, 2011. DOI: 10.1016/j.chom.2010.12.002.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, jun.2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.

RIDGWAY, D. et al. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J. Cell Biol*, v. 116, p. 307–319, 1992. DOI: 10.1083/jcb.116.2.307.

RIEGER, A. M. et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J. Vis. Exp.*, n. 50, p. 37–40, 2011. DOI: 10.3791/2597.

RIPOLI, M. et al. Hepatitis C Virus-Linked Mitochondrial Dysfunction Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 α -Mediated Glycolytic Adaptation. *J. Virol*, v.84, p. 647–660, 2010. DOI: 10.1128/JVI.00769-09.

ROBERT, V. et al. High-Resolution Single Particle Zeta Potential Characterisation of Biological Nanoparticles using Tunable Resistive Pulse Sensing. *Scientific Reports*, n. 17479, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14981-x>.

ROCHE, T. E. et al. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*, v. 70, p 33–75, 2001. DOI: 10.1016/s0079-6603(01)70013-x.

ROGER, S. et al. HCV virology and diagnosis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 45, p. 1-13, 2021. DOI: 10.1016/j.clinre.2021.101626.

ROSS-THRIEPLAND, M.; HARRIS, D. Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on!, *J. Gen. Virol*, v. 96, p. 727-738, 2015. DOI: 10.1099/jgv.0.000009.

ROUDOT-THORAVALL, F. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 45, p. 1-6, 2021. DOI: 10.1016/j.clinre.2020.101596.

SADIYA, B. et al. Curcumin attenuates IL-17A mediated pulmonary SMAD dependent and non-dependent mechanism during acute lung injury in vivo. *Molecular Biology Reports*, v. 7, p. 5643-5649, jun. 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05587-0.

SANGUANSRI, P. et al. Nanoscale materials developmenta food industry perspective. *Trends Food Sci Technol*, v. 17, p. 547–556, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>.

SARADA, S. et al. Curcumin prophylaxis mitigates the incidence of hypobaric hypoxia-induced altered ion channels expression and impaired tight junction proteins integrity in rat brain. *Journal of Neuroinflammation*, v. 12, 2015. DOI: 10.1186/s12974-015-0326-4.

SCHINDLER, A.; FOLEY, E. Hexokinase 1 blocks apoptotic signals at the mitochondria. *Cell Signal*, v. 25, p. 2685–2692, 2013. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.08.035.

SCRIMA, R. et al. Targeting Endoplasmic Reticulum and/or Mitochondrial Ca²⁺ Fluxes as Therapeutic Strategy for HCV Infection. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 1-12, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00073>.

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: 19 dez. 2019. DOI: 10.3748/wjg.v20.i32.11033.

SEMENZA, G. L. et al. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 23757–23763, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31580-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31580-6).

SEOANE, J.; GOMIS, R. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, v. 12, 2017. DOI: [10.1101/cshperspect.a022277](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022277).

SERVIDA, S. et al. Overview of Curcumin and Piperine Effects on Glucose Metabolism: The Case of an Insulinoma Patient's Loss of Consciousness. *Int J Mol Sci.*, v.7, abr. 2023. DOI: [10.3390/ijms24076621](https://doi.org/10.3390/ijms24076621).

SHAH, K., et al. Hepatitis C Virus: Molecular Pathways and Treatments In: Stambouli DO, editor. *Hepatitis C Virus: Molecular Pathways and Treatments.* (ed) 1, USA: OMICS Group eBooks; p. 27-29, 2014.

SHANMUGAM, A. et al. HCV NS5A dimer interface residues regulate HCV replication by controlling its selfinteraction, hyperphosphorylation, subcellular localization and interaction with cyclophilin A. *Plos Pathog.*, v. 14, 2018. DOI: [10.1371/journal.ppat.1007177](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007177).

SHEN, C. et al. Mutations in ISDR of NS5A gene influence interferon efficacy in Chinese patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *J Gastroenterol Hepatol.*, v. 22, p.1898-903, 2007. DOI: [10.1111/j.1440-1746.2006.04566.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04566.x).

SHI, Q. et al. PI3K-Akt signaling pathway upregulates hepatitis C virus RNA translation through the activation of SREBPs. *Virology*, v. 490, p. 99–108, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.012>.

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. DOI: [10.1038/srep15798](https://doi.org/10.1038/srep15798).

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. DOI: [10.1371/journal.pone.0061089](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061089).

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. DOI: [10.1055/s-2006-957450](https://doi.org/10.1055/s-2006-957450).

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol.*, v. 98, p. 2-3, 2017. DOI: [10.1099/jgv.0.000672](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672).

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, v. 252, p. 28–49, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>.

SIU, G. et al. Hepatitis C virus NS5A protein cooperates with phosphatidylinositol 4- kinase III α to induce mitochondrial fragmentation. *Scientific Reports*, v. 6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep23464>.

SMITH, B. Evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus. *J Viral Hepat.*, v 6, p. 41-46, 1999. DOI: [10.1046/j.1365-2893.1999.00010.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.1999.00010.x).

SMITH, D. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*, v. 59, p. 318-327, 2014. DOI: [10.1002/hep.26744](https://doi.org/10.1002/hep.26744).

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: 17 dez. 2019.

SOLANS, C. et al. Nanoemulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, v. 10, p. 102–110, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>.

SON, J. W. et al. Association of serum bone morphogenetic protein 4 levels with obesity and metabolic syndrome in non-diabetic individuals. *Endocr J*, v.58, p. 39-46, 2011. DOI: 10.1507/endocrj.k10e-248.

STEINHAEUER, D. A.; DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, v 8, p. 22:281, 1992. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90216-c.

STREET, A. et al. Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3- kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta- cateninresponsive transcription. *J. Virol*, v. 79, p. 5006–5016, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.8.5006-5016.2005.

SQUADRITO, G. et al. Is investigation of hepatitis C virus NS5A gene heterogeneity a tool for predicting longlasting response to interferon therapy in patients with HCV-1b chronic hepatitis? *J Viral Hepat*, v. 9, p. 360-369, 2002. DOI: 10.1046/j.1365- 2893.2002.00379.x.

SUCHANEK, M. et al. The mammalian oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs) bind 25-hydroxycholesterol in an evolutionarily conserved pocket. *Biochem. J*, v. 405, p. 473–480 2007. DOI: 10.1042/BJ20070176.

SYED, G. et al. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab*, v. 21, p. 33-40, 2010. DOI: 10.1016/j.tem.2009.07.005.

VEILLON, P. et al. Analyse des mutations des domaines ISDR et V3 de la protéine NS5A du virus de l'hépatite C avant le traitement par l'interféron avec ou sans ribavirine. *Pathol Biol*, v. 52, p.505-510, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.07.011>.

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: 22 dez. 2023. DOI: 10.4254/wjh.v9.i33.1239.

TAKASE, M. et al. Induction of Smad6 mRNA by Bone Morphogenetic Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 244, p. 26-29, 1998. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8200.

TANAKA, T. et al. A Novel Sequence Found at the 3'-Terminus of Hepatitis C Virus Genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.215, p. 744- 749, 1995. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2526.

TANG, H.; GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clinical Science*, v. 117, n. 2, p. 49–65, 2009. DOI: 10.1042/CS20080631.

TAWANI, A. et al. Evidences for piperine inhibiting cancer by targeting human Gquadruplex DNA sequences. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 39239, p. 1–12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep39239>.

- THOMPSON A. et al. Viral clearance is associated with improved insulin resistance in genotype 1 chronic hepatitis C but not genotype 2/3. *Gut*, v. 61, p. 128-134, 2012. DOI: 10.1136/gut.2010.236158.
- 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. DOI:10.31254/phyto.2017.6308.
- TONG, W. et al. Curcumin suppresses colon cancer cell invasion via AMPK-induced inhibition of NF- κ B, uPA activator and MMP9. *Oncol Lett*, v. 12, p. 4139–4146, 2016. DOI: 10.3892/ol.2016.5148.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KOHARA, M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci*, v 19, 2017. DOI: 10.3390/ijms19010023.
- TSUCHIYA, H. Iron-Induced Hepatocarcinogenesis-Preventive Effects of Nutrients. *Front Oncol*, v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.940552.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K. et al. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology*, v. 96, p. 1476-1483, 1992. DOI: 10.1128/JVI.66.3.
- TUNG, B. T. et al. Curcuma longa, the Polyphenolic Curcumin Compound and Pharmacological Effects on Liver. *Dietary Interventions in Liver Disease*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814466-4.00010-0>.
- 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. DOI: 10.1038/bjc.1987.190.
- TWIG, G.; SHIRIHAI, O. The Interplay Between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 14, p. 1939–1951, 2011. DOI: 10.1089/ars.2010.3779.
- UJINO, S. et al. Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *PNAS*, v. 113, p. 188-193, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1506524113.
- URBACZEK, A. et al. Recombinant hepatitis C virus-envelope protein 2 interactions with low-density lipoprotein/CD81 receptors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 534- 542, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760140441.
- VERISSIMO, T. V. et al. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. *Materials Science and Engineering*, v. 65, p. 199 – 204, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.04.030.
- VISWANADHA, V. P. et al. The protective effect of piperine against isoproterenol- induced inflammation in experimental models of myocardial toxicity. *European Journal of Pharmacology*. v. 885, 2020. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173524.
- WAKIL, S. J. et al. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem*, v. 52, p. 537– 579, 1983. DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.002541.
- WANG, G. L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, v. 92, p. 5510–5514, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.12.5510.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 90, p. 4304-4308, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.9.4304.

WANG, R. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.*, v. 1, p. 87–105, 2014. DOI: 10.1016/j.gendis.2014.07.005.

WANG, Y. Scotomas in molecular virology and epidemiology of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*, v. 19, p. 7910–7921, 2013. DOI: 10.3748/wjg.v19.i44.7910.

WANG, X. et al. New association of bone morphogenetic protein 4 concentrations with fat distribution in obesity and Exenatide intervention on it. *Lipids in Health and Disease*, v. 16, p. 1-8, abr. 2017. DOI: 10.1186/s12944-017-0462-1.

WANG, X. et al. Alteration of Bone Mineral Density Differs Between Genders in Obese Subjects After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Bone Morphogenetic Protein 4 May Count. *Obesity Surgery*, v.28, p. 3221-3226, 2018. DOI: 10.1007/s11695-018-3298-5.

WANG, X. et al. Bone morphogenetic protein 4 alleviates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting hepatic ferroptosis. *Cell Death Discovery*, v. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01011-7>.

WEISS, J. et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, v. 3, p.146–154, 2008. DOI: 10.1007/s11483-008- 9065-8.

WELLER, R. Hepatitis C Virus Strain-Dependent Usage of Apolipoprotein E Modulates Assembly Efficiency and Specific Infectivity of Secreted Virions. *Journal of Virology*, v. 91, p. 1-17, 2017. DOI: 10.1128/JVI.00422-17.

WONG, L. et al. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v. 20, p. 85–101, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0071-5>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global hepatitis report, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>. Acesso em: 03 jan. 2023.

WOZNEY, J. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, v. 242, p. 1528-1534, 1988. DOI: 10.1126/science.3201241.

XU, C. et al. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol*, v. 12, p. 7621–7625, 2006. DOI: 10.3748/wjg.v12.i47.7621.

YANG, Y. et al. Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. *Endocrinology*, v. 150, p. 727–740, 2009. DOI: 10.1210/en.2008-0090.

YANG, Y. et al. BMP-2 suppresses renal interstitial fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biochem*, v. 112, p. 2558-2565, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.23180>.

YECIES, J. L. et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab*, v. 14, p. 21–32, 2011. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.06.002.

YUSUF, H. et al. Formulation Design and Cell Cytotoxicity of Curcumin-Loaded Liposomal Solid Gels for Anti-Hepatitis C Virus. *Adv Pharmacol Pharm Sci.*, v.2022, p. 1-8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/3336837>.

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: 22 dez. 2022. DOI: 10.4254/wjh.v5.i10.528.

ZHANG, F. et al. Infection of Hepatocytes With HCV Increases Cell Surface Levels of Heparan Sulfate Proteoglycans, Uptake of Cholesterol and Lipoprotein, and Virus Entry by Up-regulating SMAD6 and SMAD7. *Gastroenterology*, v. 152, p. 257-270, 2017. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.033.

ZHANG, J. et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. *Mol Immunol*, v. 116, p. 29-37, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.020>

ZHANG, Y. et al. Anti-inflammatory effects of novel curcumin analogs in experimental acute lung injury. *Resp Res*, v. 16, 2015. DOI: 10.1186/s12931-015-0199-1.

ZHANG, Y. et al. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature*, v. 383, p.168–172, 1996. DOI: 10.1038/383168a0.

ZHAO, M. et al. Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J Cell Biol*, v. 157, p.1049–1060, 2002. DOI: 10.1083/jcb.200109012.

ZEISEL, M.; FELMLEE, D.; BAUMERT, T. Hepatitis C virus entry. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 369, p. 87-112, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642- 27340-7_4.

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. DOI: 10.1038/srep29521.

ZIEGENHAGEN, R. et al. Safety Aspects of the Use of Isolated Piperine Ingested as a Bolus. *Foods*, v.10, 2021. DOI: 10.3390/foods10092121.

ZOU, M. L. et al. The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front. Mol. Biosci*, v. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.593310>.