

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

RUTE LOPES

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

TESE DE DOUTORADO

**Araraquara - SP
2019**

RUTE LOPES

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

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

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

**Araraquara - SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

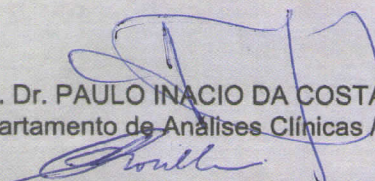
TÍTULO DA TESE: "Estudo do efeito de compostos naturais bioativos no metabolismo lipídico de células Huh-7.5 e sua interação com o ciclo de replicação do vírus da hepatite C em células expressando o SGR-JFH1"

AUTORA: RUTE LOPES

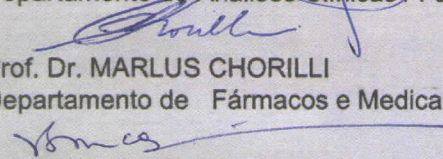
ORIENTADORA: ANA MARIA MINARELLI GASPAR

COORDENADOR: PAULO INACIO DA COSTA

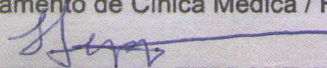
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA

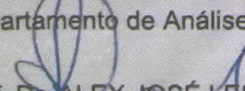
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

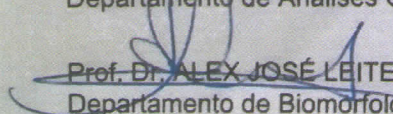
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


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

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


Prof.ª Dr.ª IRACILDA ZEPPONE CARLOS

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


Prof. Dr. ALEX JOSÉ LEITE TORRES

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

Araraquara, 03 de outubro de 2019

Dados Curriculares

Nome: Rute Lopes

Nome em citações bibliográficas: LOPES, R.

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA

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

TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS

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

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

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

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

COORIENTAÇÃO

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

OUTROS

Colaboração no desenvolvimento dos trabalhos de pós-graduação (doutorado) da aluna Isabela Haddad Peron intitulado “Estudo *in vitro* da influência dos compostos licopeno, hesperidina e tangeritina sobre a via lipídica associada à replicação e formação da lipopartícula do vírus da hepatite C” e da aluna Moema de Souza Santana intitulado “Efeito de compostos naturais bioativos sobre o metabolismo lipídico e a produção de estresse oxidativo durante a replicação do vírus da hepatite C em cultura celular – VHCcc”.

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

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

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

À “Apath L.L.C.”, detentora das linhagens celulares Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o *replicon* subgenômico SGR-JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis-1*, genótipo 2a), que autorizou o uso das células, e à Prof.^a Dr.^a Paula Rahal do Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP), que as cedeu gentilmente ao coorientador desta pesquisa Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, da FCFAr-UNESP/Araraquara.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada a todos!

Rute

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

I. Introdução

I. INTRODUÇÃO

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

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2015 a hepatite C crônica acometeu 71 milhões de pessoas. Neste mesmo ano, a prevalência global da doença foi de 1% da população, sendo que o número de recém-infectados (1,75 milhão) excedeu o de mortes (399 mil) diretamente relacionadas a complicações hepáticas decorrentes da doença crônica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Os dados epidemiológicos no Brasil para hepatites virais são escassos e muitas vezes divergentes, pois apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória, o sistema informacional dispõe de bancos de sangue e hemocentros como principal fonte notificadora em áreas geográficas restritas e é, portanto, grupo-específico, o que dificulta a estimativa para a população geral (CARVALHO *et al.*, 2014; CRUZ; SHIRASSU; MARTINS, 2009; MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2010). Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, de 1999 a 2016 foram registrados 155 mil casos em que ambos os marcadores anti-HCV e RNA-HCV foram detectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

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

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

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

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

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

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

II. Revisão Bibliográfica

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O metabolismo lipídico

O fígado é o principal órgão responsável pela homeostase energética, que regula o metabolismo lipídico, de carboidratos e de proteínas (RUI, 2014). Os hepatócitos atuam na absorção, esterificação, oxidação e secreção de ácidos graxos, e estão envolvidos com os processos de glicólise (degradação da glicose), glicogenólise (degradação do glicogênio), glicogênese (síntese de glicogênio a partir da glicose), lipogênese (síntese de triglicérides e ácidos graxos), lipólise (hidrólise de lipídios) e cetogênese (conversão de ácidos graxos não esterificados em corpos cetônicos) (RUI, 2014; XU *et al.*, 2013).

O metabolismo lipídico pode ser basicamente dividido em duas vias, o transporte direto do colesterol para a corrente sanguínea, que pode ser proveniente do intestino (via exógena) ou do fígado (via endógena), e o transporte reverso, equivalente ao retorno do colesterol ao fígado (REMMERIE; SCOTT, 2018).

A via exógena do transporte direto consiste na síntese de quilomícrons, compostos por colesterol e triglicérides, ocorrendo em células epiteliais intestinais a partir de gorduras dos alimentos, que são liberados no sistema linfático para adquirir a apolipoproteínas B (apoB-48) e depois são transportados pela corrente sanguínea, onde se ligam à apoC-II, apoC-III e apoE. A apoC-II interage com a lipoproteína lipase (LPL), enzima que hidrolisa triglicérides presentes nos quilomícrons para liberar ácidos graxos, que são então capturados por adipócitos ou hepatócitos (CRUZ-GARCIA; SCHLEGEL, 2014; WANG, Y.; SUN-WATERHOUSE, 2019).

Na via endógena, que ocorre no fígado, a síntese de VLDL pode ser observada em duas etapas sequenciais, começando pela formação de pré-VLDL, quando a apoB é co-traduzida e translocada através de um canal proteico na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) e adquire uma pequena quantidade de triglicérides, fosfolipídios e ésteres de colesterol. Nesta etapa, se a apoB não estiver corretamente enovelada ou se a quantidade de lipídios adquirida for insuficiente, a molécula é rapidamente degradada e o processo é aparentemente o principal determinante da quantidade de apoB que é secretada na circulação associada ao VLDL. A obtenção de triglicérides pela apoB é mediada pela proteína microssomal transferidora de triglicérides (MTTP), enzima limitadora para a

formação de VLDL, que atua no lúmen do RER como carreadora de triglicérides e fosfolípidios à apoB recém-sintetizada. Na segunda etapa, a pequena e densa molécula de pré-VLDL sofre maturação pela obtenção adicional de triglicérides, processo que provavelmente ocorre primariamente pela fusão entre VLDL nascente e gotículas de triglicérides no lúmen da via secretória, onde apolipoproteínas permutáveis como apoC e apoE podem se ligar ao VLDL (DIFFENDERFER *et al.*, 2016; SAHINI; BORLAK, 2014). A partícula madura de VLDL é secretada do hepatócito para a corrente sanguínea (WANG, N. *et al.*, 2016), etapa que não é mediada por MTTP, e sim dependente do fator de ribosilação de ADP-1, o ARF-1 (DIFFENDERFER *et al.*, 2016; SAHINI; BORLAK, 2014).

O metabolismo lipídico é regulado por estímulos neuroendócrinos e por fatores de transcrição, receptores nucleares, coativadores e moléculas efetoras, em vias de sinalização intracelular que inibem ou estimulam a síntese de moléculas necessárias para determinada resposta (RUI, 2014; XU *et al.*, 2013). A serina-treonina quinase (Akt), também chamada de proteína quinase B (PKB), é uma enzima fundamental na via de regulação de vários processos de sinalização intracelular, envolvidos na sobrevivência celular (HIRATA *et al.*, 2018). A Akt apresenta três isoformas, a Akt1, que está relacionada à regulação de crescimento e é a isoforma mais prevalente nas células, a Akt2, que atua no controle de metabolismo e a Akt3 que também regula crescimento, contudo é mais expressa no cérebro (SEMENKOVICH; GOLDBERG; GOLDBERG, 2016). A Akt, fosforilada como consequência da ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), é uma quinase lipídica relacionada à resposta à insulina e ao metabolismo celular, ativada por sinais extracelulares. Um desses sinais é observado na via PI3K-Akt-mTOR (alvo mamífero da rapamicina), que apresenta como resultado o crescimento celular e a regulação do metabolismo da glicose (JÓZWIAK *et al.*, 2014; MANNING; TOKER, 2017). Para que ocorra a ativação máxima da quinase Akt1, ambos os resíduos Thr308 e Ser473 devem ser fosforilados. A fosforilação em Ser473 é realizada por mTORC2, enquanto que a sua inativação é realizada por fosfatases lipídicas como PTEN (homólogo de fosfatase e tensina) e INPP4B (fosfatase inositol polifosfato-4 tipo II B), além de PHLPP1 e PHLPP2 (fosfatases proteicas de domínio PH rico em repetição de leucina 1 e 2) que são fosfatases fisiológicas de Ser473 em Akt (MANNING; TOKER, 2017).

A ingestão excessiva de calorias e o aumento intracelular da concentração de gotículas lipídicas (LDs, do inglês *lipid droplets*) estão associados à estimulação de mTOR, que constitui a subunidade catalítica dos complexos mTORC1 e mTORC2. O emprego de lipídios por lipofagia envolve a regulação de genes autofágicos, como a proteína CREB (proteína de ligação responsiva ao AMP cíclico), o receptor FXR (receptor nuclear farnesoide X) e o receptor PPAR- α (receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma). Assim, PI3K e Akt regulam a lipogênese e a expressão de genes lipogênicos em vários tipos de células, e mTOR regula a tradução de proteínas (JÓZWIAK *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2018).

Um dos principais sensores energéticos do organismo é a proteína quinase AMPK (proteína quinase ativada por 5'-adenosina monofosfato). Ela atua na regulação metabólica, e está intimamente associada à glicólise, pois é ativada durante a depleção da reserva de ATP, quando há o aumento na razão AMP/ATP devido à restrição calórica ou ao aumento da demanda por energia (MUSSO; CASSADER; GAMBINO, 2016; NAVARRO-YEPES *et al.*, 2014). AMPK regula a autofagia para garantir a disponibilidade de nutrientes às células em períodos de jejum prolongado, através da regulação de ULK1 (quinase 1 Unc-51 símile ativadora de autofagia) e do complexo mTORC1. AMPK também pode ser ativada pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais, decorrente de hipóxia (NAVARRO-YEPES *et al.*, 2014).

As vias de sinalização Akt e AMPK possuem várias etapas de regulação cruzada. Akt está associada com a absorção de glicose e a produção de ATP por glicólise, o que mantém AMPK inativa. Akt também pode bloquear a ativação de AMPK diretamente, através da obstrução da fosforilação de AMPK por LKB1 (quinase hepática B1). Em determinadas situações, as duas vias atuam de forma equivalente; em outras, assumem papéis opostos, como na síntese proteica, lipogênese, glicogênese, na sinalização de mTORC1 e em autofagia (MANNING; TOKER, 2017).

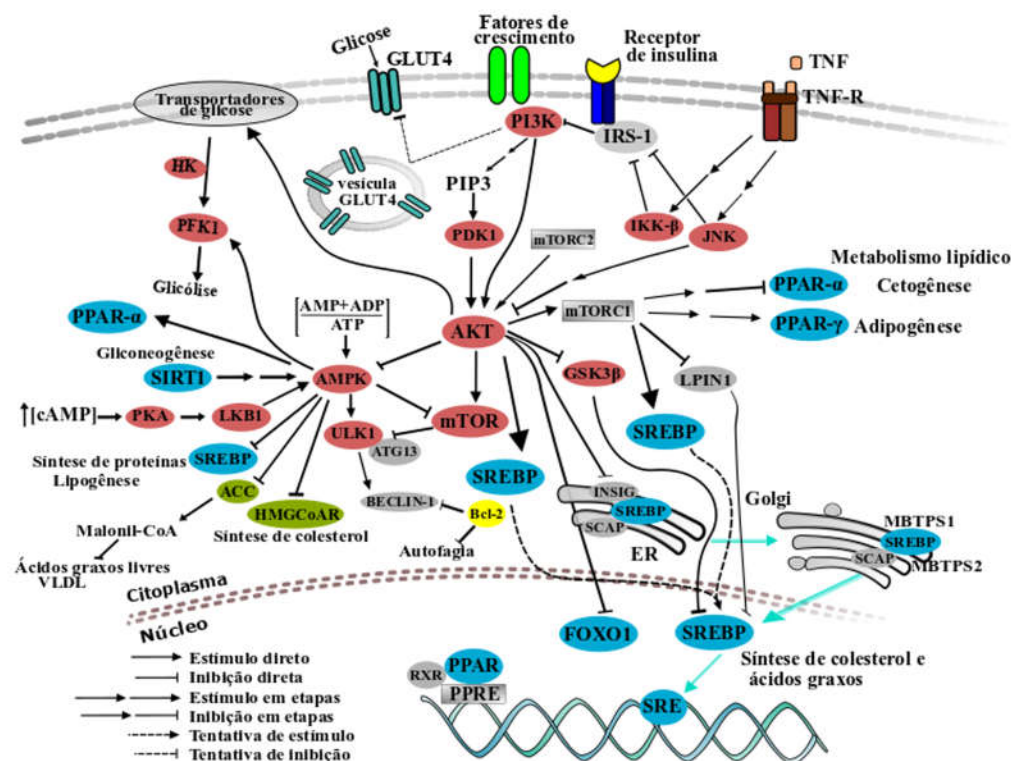
A ativação de AMPK também pode ocorrer a partir da acetilação da proteína SIRT1 (sirtuína 1), que estimula o estado de depleção calórica. Este efeito acarreta a lipogênese *de novo* reduzida, sensibilidade à insulina aumentada, lipólise e a oxidação mitocondrial de ácidos graxos (LI *et al.*, 2015; MUSSO; CASSADER; GAMBINO, 2016).

A fosforilação de AMPK pode atenuar a esteatose hepática não alcoólica através da supressão de vários fatores lipogênicos importantes no fígado, que estão relacionados à síntese de colesterol e ácidos graxos, como o SREBP-1 (proteína de ligação ao elemento regulador de esterol), resultando na redução da síntese de triglicérides, dos níveis da enzima HMG-CoAR (3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase), redução da síntese de colesterol e 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; SU *et al.*, 2017). Um dos principais reguladores transcricionais no metabolismo lipídico é o SREBP, fator de transcrição nuclear que controla a expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos (MCRAE *et al.*, 2016; MUSSO; CASSADER; GAMBINO, 2016).

A clivagem de SREBPs pode ser estimulada pela via PI3K-Akt-mTOR (DEBOSE-BOYD; YE, 2018). A ativação e o acúmulo de SREBP-1c pela insulina e pela via Akt-mTORC1 no fígado aumentam a síntese lipídica *de novo* e também atuam na síntese proteica através de processos de crescimento celular (MANNING; TOKER, 2017; RÖHRIG; SCHULZE, 2016). A fosforilação de Akt inibe GSK3 β (glicogênio sintase quinase 3 β), o que induz o processamento de SREBP e aumenta sua estabilidade, promovendo a expressão de enzimas de biossíntese lipídica (RÖHRIG; SCHULZE, 2016).

A esteatose hepática pode ser causada pelo estímulo de receptores de TSH expressos em hepatócitos, via SREBP-1c. Hormônios da tireoide induzem a expressão de HMG-CoAR e FDPS (farnesil pirofosfato sintetase) para estimular a síntese hepática de colesterol, regulando positivamente os níveis de receptores LDL para aumentar o efluxo de colesterol de tecidos periféricos e intensificam o metabolismo de HDL pela estimulação da atividade de CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol) (SINHA; SINGH; YEN, 2018).

A Figura 1 relaciona as principais vias de sinalização celular associadas ao metabolismo lipídico.

Figura 1. Via de sinalização intracelular relacionada ao metabolismo lipídico.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: ACC: acetil-CoA carboxilase; Akt: serina-treonina quinase; AMPK: proteína quinase ativada por 5'-adenosina monofosfato; ATG 13: proteína-13 relacionada à autofagia; Bcl-2: proteína linfoma 2 de célula-B; Beclin-1: ortólogo de mamífero do gene relacionado à autofagia de levedura 6; ER: retículo endoplasmático; FoxO: fatores de transcrição "Forkhead" da família da FoxO; GLUT-4: transportador de glicose-4; GSK3β: glicogênio sintase quinase 3β; HMG-CoAR: enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase; HK: hexoquinase; INSIGs: genes induzidos por insulina; IKK-β: fator nuclear kappa-B quinase subunidade β; IRS-1: receptor de insulina substrato-1; JNK: quinase Jun N-terminal; LKB1: quinase de fígado B1; LPIN1: lipina 1 fosfatídico-fosfatase; MBTPS: protease fator de transcrição ligada à membrana sítio-(1/2); mTORC: complexo alvo mamífero da rapamicina; PDK1: quinase fosfatidilinositol dependente-1; PFK1: fosfofrutoquinase 1; PI3K: fosfatidilinositol-3 quinase; PKA: proteína quinase cAMP-dependente; PPAR: receptor ativado por proliferador de peroxissoma; PPRES: elementos responsivos específicos a PPAR; RXR: receptores X retinoide; SCAP: proteína ativadora da clivagem de SREBP; SIRT1: sirtuína 1; SREBP: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol; TNF: fator de necrose tumoral; ULK1: quinase Unc-51-símile ativadora de autofagia 1.

A infecção pelo HCV resulta em alterações de várias vias de sinalização e metabolismo celular. Em estudo em cultura celular, o HCV ativou Akt no estágio inicial de infecção para facilitar sua entrada. Também foi observado que esta

ativação foi mediada pela interação entre a proteína de envelope E2 do HCV e seus receptores celulares, CD81 e claudina-1. Inibidores de Akt foram adicionados à cultura infectada por HCV e verificou-se que os níveis de proteína de capsídeo viral sofreram diminuição significativa, sugerindo função de regulação positiva de Akt, que facilitaria a infecção pelo HCV (LIU, ZHE *et al.*, 2012).

Em células infectadas com HCV foi observada a inibição da fosforilação de AMPK, correspondente à estimulação da fosforilação de Akt. Além disso, o tratamento com agonistas de AMPK efetivamente inibiu a replicação genômica viral e o acúmulo de lipídios, sugerindo que o restabelecimento da atividade de AMPK pode ser alvo de agentes terapêuticos contra o HCV (MANKOURI *et al.*, 2010).

Uma das formas que o HCV promove o acúmulo intracelular de lipídios é através do aumento da lipogênese *de novo* e da formação de LDs pela ativação de SREBPs, eventos estes que são fundamentais para a replicação do HCV e para a progressão da doença hepática relacionada à cronicidade da infecção viral. Acredita-se que a ativação de SREBPs pela proteína NS4B viral ocorre através da via de Akt (MCRAE *et al.*, 2016). Da mesma forma, Neufeldt e colaboradores (2018) observaram a indução da ativação da via de SREBP pelas proteínas NS4B e de capsídeo viral, com consequente aumento dos níveis de FASN e HMG-CoAR.

Quanto aos fatores de transcrição FoxO, sabe-se que eles regulam o metabolismo e crescimento de hepatócitos e respondem a condições de estresse. O FoxO-1 é ativado na infecção pelo HCV, contribuindo para a resistência à insulina. Além disso, nas células infectadas por HCV, FoxO-3 é translocado para o núcleo ativando sua atividade de transcrição e, com a atividade aumentada, FoxO-3 modula a sinalização da resposta imune inata (TIKHANOVICH *et al.*, 2014).

Desta forma, sabe-se que as vias de montagem e de liberação do HCV, a entrada do vírus no hepatócito, assim como a infectividade das partículas virais, estão intimamente ligadas à síntese e secreção de lipoproteínas (AIZAWA *et al.*, 2015). Portanto, torna-se relevante o conhecimento do vírus da hepatite C concomitantemente às vias de sinalização celular que podem facilitar a infecção ou a replicação viral, para que os mecanismos intracelulares sejam compreendidos pormenorizadamente, possibilitando o estudo de novos métodos de controle ou inibição da doença.

2.2. Hepatite C

A infecção pelo HCV pode ser aguda, geralmente assintomática, progredindo para a cura espontânea, o clareamento viral, em 15 a 45% dos casos dentro de até 6 meses após a infecção. Os outros 55 a 85% evoluem para a cronicidade. Destes, 5 a 20% apresentam cirrose em até 30 anos, e 1 a 5% vêm a óbito em decorrência da doença, por cirrose ou câncer hepático (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A coinfeção com outro vírus de via de contaminação similar, como o HIV e o HBV, pode caracterizar avanço mais acelerado da doença (GONZALEZ *et al.*, 2015; POKORSKA-ŚPIEWAK *et al.*, 2015).

A evolução da doença é multifatorial (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). O genótipo exerce influência importante, pois pessoas infectadas com o genótipo 3 exibem rápida progressão à cirrose hepática e maior risco de desenvolver esteatose hepática e carcinoma hepatocelular (DE NICOLA *et al.*, 2014; NIREI *et al.*, 2017). Este genótipo também é menos responsivo ao tratamento com DAAs, em relação aos demais genótipos (AMANO *et al.*, 2017).

As proteínas do HCV modulam diferentes vias de sinalização relacionadas ao metabolismo celular, para promover uma resposta imune que causa a inflamação crônica (JEE *et al.*, 2016; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014). Desta forma, a hepatite C crônica e a resposta inflamatória resultantes estão associadas a manifestações extra-hepáticas como glomerulonefrite, distúrbios de 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).

As mutações espontâneas com inclusão de variações em nucleotídeos no mesmo genótipo e subtipo de HCV, chamadas de *quasispecies*, propiciam que a infecção seja composta por um conjunto de partículas virais heterogêneas, o que favoreceria a evasão do sistema imune do hospedeiro e o estabelecimento de infecção crônica, influenciando a resistência ao tratamento e dificultando a elaboração de vacina (ECHEVERRÍA *et al.*, 2015). Portanto, a prevenção da doença é fundamental para a redução dos níveis da infecção, o que inclui o tratamento dos indivíduos infectados, o rápido diagnóstico da doença, a conscientização e o

acompanhamento dos grupos com maior vulnerabilidade, como usuários de drogas ilícitas por meio de compartilhamento de seringa e agulha, receptores de hemocomponentes e hemoderivados, exposição de profissionais da área da saúde ou em estabelecimentos que realizam procedimentos de contato com sangue como tatuagens, *piercings*, acupuntura e manicures (MANNS *et al.*, 2017).

Quanto ao tratamento, antes do uso de DAAs eram administrados o PEGIFN- α e a ribavirina, com eficácia variável conforme o genótipo viral, e era frequentemente pouco tolerado por causar efeitos adversos severos, muitas vezes propiciando a descontinuidade do tratamento (BUTT *et al.*, 2016; KUMTHIP; MANEEKARN, 2015; LIU, F. *et al.*, 2016). Então, a terapia foi melhorada significativamente com a adição de DAAs, que apresentam alta resposta virológica sustentada, redução de tempo de duração do tratamento e das dosagens, via oral preferencial de administração, e efeitos colaterais minimizados. Apesar dos avanços atingidos, a resistência ao medicamento e a eficácia específica a genótipos ainda são desafios a serem enfrentados (POPESCU *et al.*, 2014; SCHEEL; RICE, 2013).

Atualmente, segundo o Ministério da Saúde, o tratamento da hepatite C no Brasil pode englobar os medicamentos PEGIFN- α -2a, ribavirina, os DAAs daclatasvir, sofosbuvir, glecaprevir, pibrentasvir, velpatasvir, ledipasvir, elbasvir, e também a alfaepoetina, para elevar ou manter o nível de hemácias no sangue, e o filgrastim, para estimular a produção de neutrófilos. Os esquemas e posologias podem ser diferenciados de acordo com as indicações para determinadas populações e o preço de oferta das indústrias fabricantes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

2.2.1.A partícula viral

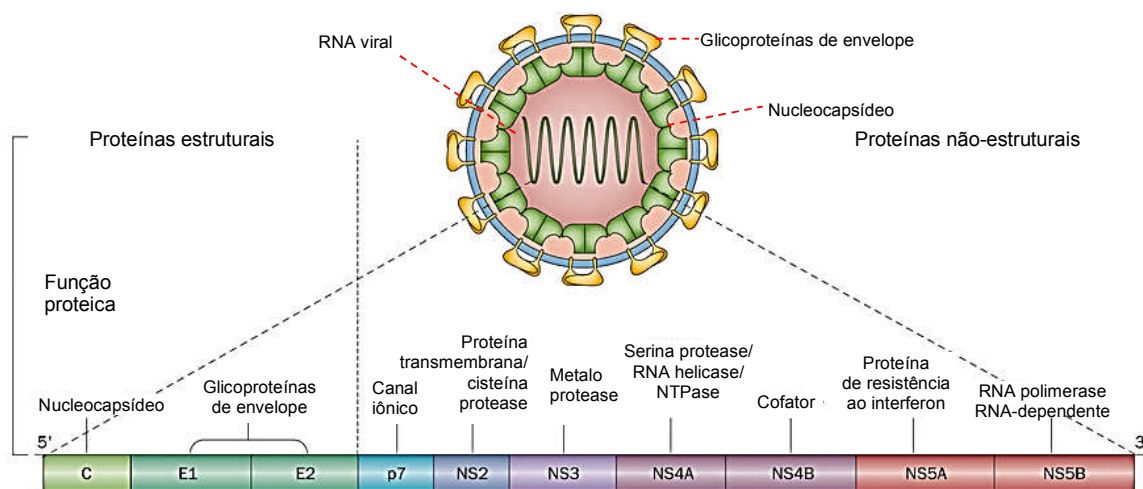
Atualmente foram descritos e confirmados 6 genótipos e 67 subtipos do vírus da hepatite C (MESSINA *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2014), consequência da alta capacidade de mutação e replicação do vírus (NOORALI; PACE; BAGASRA, 2011). A replicação do HCV ocorre em hepatócitos, sendo que algumas etapas da via de montagem ainda não estão completamente elucidadas.

O vírus da hepatite C (HCV) foi primeiramente descrito por Choo e colaboradores (1989). É um vírus da família Flaviviridae, constituído por RNA

genômico fita simples de polaridade positiva com cerca de 9600 nucleotídeos, envelopado em bicamada lipídica. O RNA genômico é composto por uma única fase de leitura aberta (ORF) delimitada por regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs). A região 5'-UTR contém um sítio interno de entrada ribossomal tipo III (IRES) que é crítico para a replicação viral (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013; PRECIADO *et al.*, 2014). O RNA codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, clivada por proteases virais e do hospedeiro em 3 proteínas estruturais: o capsídeo (*core*), as glicoproteínas de envelope E1 e E2, além de 7 proteínas não estruturais, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. (CHAMPEIMONT *et al.*, 2016; DUBUISSON; COSSET, 2014).

A Figura 2 mostra um esquema da partícula viral da hepatite C e das proteínas codificadas pelo RNA.

Figura 2. Modelo da estrutura da partícula do HCV.



Fonte: Adaptado de MORALES; FABRIZI, 2015.

A proteína do capsídeo liga-se ao RNA viral formando o nucleocapsídeo. A p7 é um polipeptídeo hidrofóbico que forma oligômeros, com função de canal iônico, envolvida nas etapas de montagem e liberação viral. A NS2 é uma proteína transmembrana multifuncional, que atua como uma cisteína-protease autocatalítica, e é necessária para a montagem e replicação. A NS3 inclui uma região serina-protease na região N-terminal e a função RNA helicase/NTPase no domínio C-terminal; esta é a segunda protease a processar o polipeptídeo viral. Após a

interação entre capsídeo e NS5A na superfície de LDs, a NS3 atua na montagem da partícula viral contendo o capsídeo. A NS4A é uma pequena proteína hidrofóbica que serve como cofator para a ação serina-protease da NS3. A NS4B induz o rearranjo da membrana intracelular para permitir a formação do complexo de replicação. A NS5A é uma fosfoproteína multifuncional necessária para a replicação e montagem viral. A NS5B é a RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp), que forma um complexo de replicação juntamente com a NS3, a NS4A, a NS4B e a NS5A, e é a principal enzima para a replicação viral, promovendo a síntese de genomas intermediários de fitas de RNA de polaridade negativa. A RdRp viral não tem a capacidade de revisão, e por isso várias mutações não são evitadas, o que viabiliza a alta variabilidade genética e a formação de *quasispecies* para as mutações adaptadas do HCV (JONES; MCLAUCHLAN, 2010; KUMTHIP; MANEEKARN, 2015; POPESCU *et al.*, 2014).

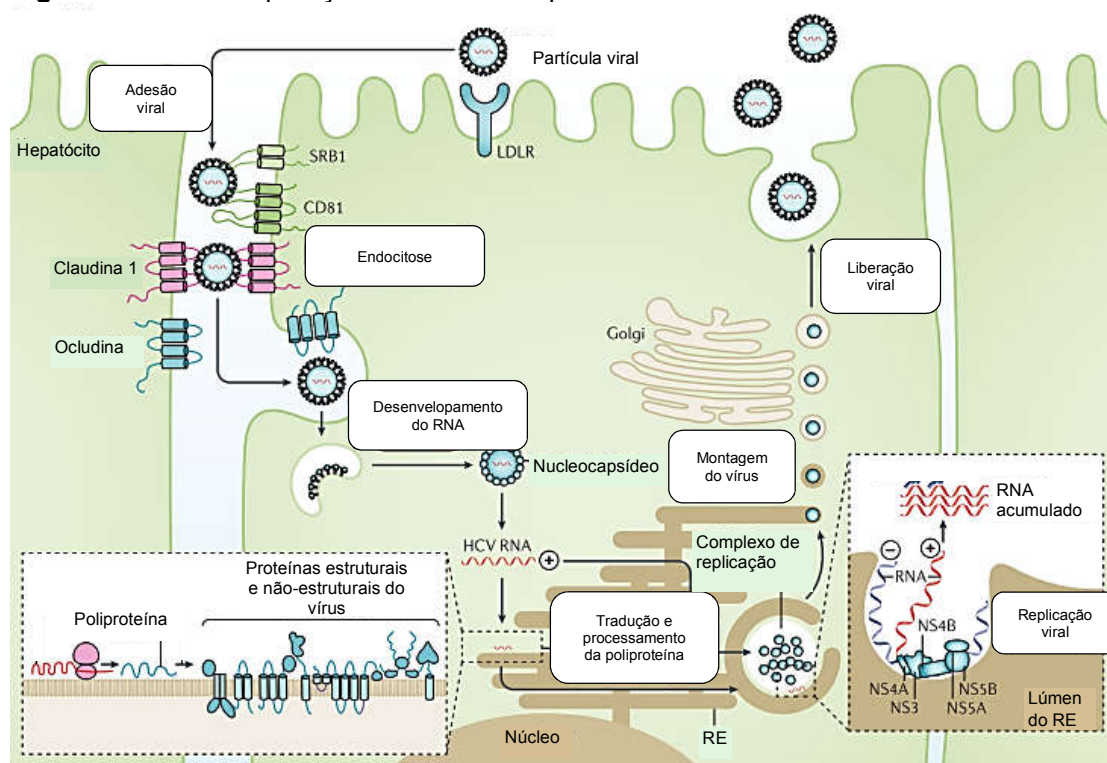
2.2.2.O ciclo de replicação do HCV

A Figura 3 esquematiza o ciclo de replicação do VHC. Sabe-se que a entrada do vírus nas células hepáticas inicia-se pela interação das glicoproteínas de envelope E1 e E2, que formam um heterodímero com heparan sulfato glicosaminoglicanos. O HCV é encontrado associado ao LDL ou ao VLDL, e, desta forma, o receptor de LDL é também uma das vias de ligação do vírus à célula. Outros receptores envolvidos na entrada do vírus na célula incluem o receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI), a tetraspanina CD81, o receptor de absorção de colesterol Niemann-Pick C1-like 1 e as proteínas de junção de oclusão celular, claudina-1 e ocludina (BARTENSCHLAGER; COSSET; LOHMANN, 2010; GEROLD; RICE, 2011; LINDENBACH; RICE, 2013; UJINO *et al.*, 2016; URBACZEK *et al.*, 2015).

A entrada do HCV na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina, que confere baixo pH endossomal e promove 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 RER. A fita de RNA positiva é replicada em fita negativa, que é usada para a síntese de outras fitas positivas por meio de intermediário replicativo. Este genoma de fita positiva recém-sintetizado

pode ser empregado em tradução de novas proteínas virais, replicação de maiores quantidades de RNA e montagem de novos vírions infecciosos. As poliproteínas sintetizadas são clivadas pelas enzimas sinalase e sinal-peptidase do hospedeiro, gerando a proteína estrutural p7, e pelas NS2-3 cisteína protease e NS3-4A serina protease, que processam as proteínas não estruturais. A NS4B induz rearranjos de membrana, resultando na formação da teia membranosa, uma estrutura de bicamada, que é o sítio de replicação do RNA viral (BARTENSCHLAGER; COSSET; LOHMANN, 2010; LINDENBACH; RICE, 2013).

Figura 3. Ciclo de replicação do vírus da hepatite C.



Fonte: Adaptado de MANNS *et al.*, 2017.

A formação de novas partículas virais é iniciada na superfície das LDs pela interação entre capsídeo, NS5A e RNA genômico. Aparentemente, o nucleocapsídeo é arranjado em torno da membrana do RER, onde as proteínas E1, E2 e p7 estão próximas (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013; LINDENBACH; RICE, 2013; MANNS *et al.*, 2017). Nos estágios finais do ciclo de replicação viral, o HCV utiliza-se de diversas etapas da via de formação do VLDL, incluindo montagem, maturação, degradação e maquinaria secretória da célula. Em

microdomínios ricos em lipídios do RER, acredita-se que o nucleocapsídeo seja transferido a LDs do lúmen, e este conjunto sofra fusão com partículas de pré-VLDL contendo apoB para formar partículas lipovirais, que também apresentam apoE e apoC, e são liberadas pela via secretória do complexo de Golgi. A MTTP é responsável pela transferência de triglicérides e fosfolipídios em LDs nascentes e também está envolvida na montagem do HCV (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009; JONES; MCLAUCHLAN, 2010; SCHEEL; RICE, 2013). A Figura 3 esquematiza o ciclo de replicação do HCV.

2.3. Compostos naturais bioativos

Considerando a gravidade da hepatite C e o impacto em saúde pública, há uma necessidade crescente para o estudo e desenvolvimento de produtos que possam auxiliar os tratamentos instituídos de forma sinérgica, com alta eficácia, para reduzir ou extinguir os efeitos colaterais ou apresentar efeito hepatoprotetor, e ser resistente aos mecanismos de evasão e de mutagênese viral. É neste cenário que compostos naturais bioativos (CNBs) apresentam-se como alternativa, com diversas vantagens.

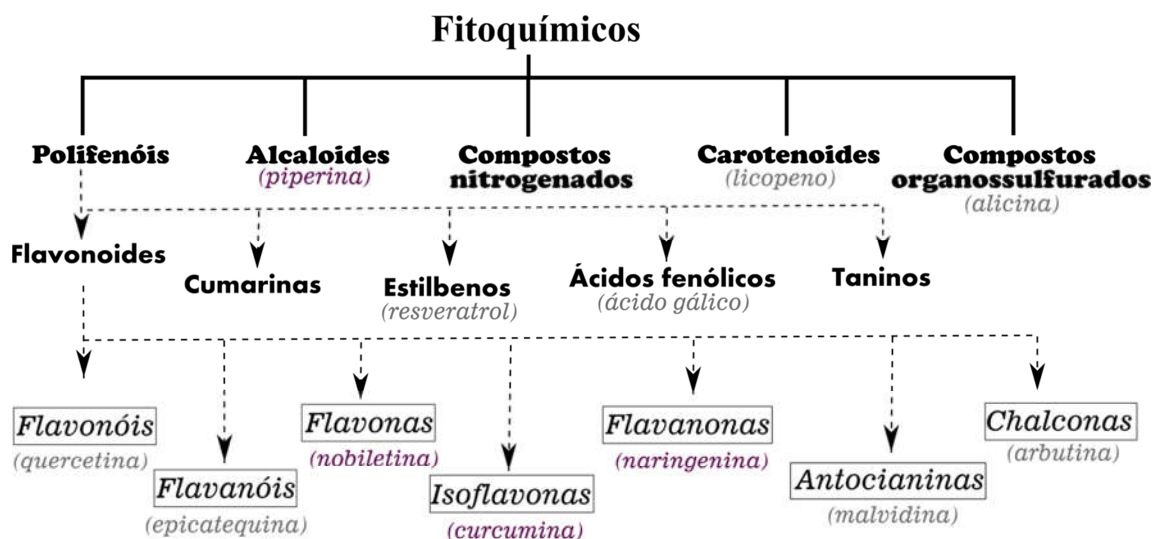
As plantas produzem compostos, os fitoquímicos, responsáveis pelas funções essenciais de crescimento e desenvolvimento (ZAKARYAN *et al.*, 2017). Estes formam a base de sistemas farmacológicos tradicionais, como, por exemplo, a papaverina de *Papaver somniferum*, usada para tratamento de resfriados, tosse, inflamação, e é a base do verapamil, um antiarrítmico; da mesma planta também são extraídos opióides, como a morfina e a codeína. A galega de *Galega officinalis* foi usada como modelo para o desenvolvimento de metformina (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Produtos naturais, por sua vez, são compostos puros ou misturas derivados de metabólitos primários ou secundários de células, tecidos e secreções de micro-organismos, plantas ou animais (LOVELACE; POLYAK, 2015). A pesquisa de produtos naturais resultou em compostos com atividade biológica diversificada, incluindo atividade antiviral e hepatoprotetora (CALLAND *et al.*, 2012). Os CNBs são uma classe de produtos naturais, derivados de alimentos que apresentam benefícios contra doenças, e podem ser alimentos funcionais, suplementos dietéticos, nutrientes isolados, produtos fitoterápicos ou alimentos processados (BIESALSKI *et*

al., 2009; SILVA *et al.*, 2015). Muitos destes compostos têm sido estudados pelo seu potencial como coadjuvantes terapêuticos no tratamento de diversas doenças, inclusive como inibidores do ciclo de replicação viral do HCV, atuando em diferentes etapas e com desempenho também variável.

Os CNBs podem ser classificados em 5 grupos principais: polifenóis, carotenoides, alcaloides, compostos nitrogenados e compostos organossulfurados. Os polifenóis apresentam subgrupos que correspondem ao número de anéis fenólicos que apresentam: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e taninos. Os flavonoides são classificados em subgrupos: flavonóis, flavanóis ou catequinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanonóis, antocianinas e chalconas (LIU, R. H., 2013; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016; RAMOS; LIMA; PEREIRA-WILSON, 2011). A classificação de fitoquímicos está esquematizada na Figura 4.

Figura 4. Classificação dos fitoquímicos.



Fonte: Adaptado de RAMOS; LIMA; PEREIRA-WILSON, 2011.

Neste trabalho o efeito dos CNBs curcumina, piperina, a administração simultânea de curcumina e piperina, naringenina e nobiletina, foi avaliado em relação à atividade em hepatócitos humanos, em diversos aspectos. Estes compostos foram escolhidos por apresentarem estudos prévios de alguma forma correlatos com efeitos hepatoprotetores ou antivirais, entre outras atividades biológicas.

2.3.1. Curcumina

A curcumina é o ingrediente ativo do açafrão, um composto fenólico de coloração amarela utilizada como condimento alimentar extraída da raiz do açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.). Sua estrutura química confere maior solubilidade em metanol, etanol, DMSO e acetona (GHOSH; BANERJEE; SIL, 2015). É alvo de várias pesquisas clínicas e laboratoriais com a finalidade de investigar os efeitos analgésico, hepatoprotetor, anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antitumoral, antiparasitário, e no tratamento de diversas enfermidades, como asma, diabetes, dermatite e Alzheimer (ASSIS *et al.*, 2017; KONDURU; LEE; LI, 2016; NABAVI *et al.*, 2014; THOMPSON *et al.*, 2017).

O efeito inibitório da curcumina engloba diversos micro-organismos, como bactérias, fungos, parasitos e vírus, incluindo HCV, HBV e HIV. O mecanismo de ação, contudo, não é o mesmo em todos os casos. A curcumina é capaz de inibir a sinalização celular em diferentes etapas, em alguns casos atuar diretamente sobre a maquinaria de replicação viral, reduzir a atividade de enzimas ou até mesmo degradar proteínas específicas (RECHTMAN *et al.*, 2010).

Em estudo com HCV *in vitro*, a curcumina exibiu efeito inibitório relativo à replicação viral, correlacionado com a indução da enzima heme oxigenase-1 e inibição da via PI3K-Akt, que atua no aumento da sobrevivência celular. A proteína NS5A viral liga-se ao PI3K, aumentando sua atividade de fosfotransferase. A via da Akt também foi relacionada à ativação e acúmulo de SREBP-1, um fator de crescimento que regula genes envolvidos em síntese de colesterol e de ácidos graxos. A proteína NS4B foi anteriormente descrita pela capacidade de aumentar os níveis de expressão de SREBPs e ácido graxo sintase, levando ao acúmulo de lipídios em hepatócitos (CHEN, M. H. *et al.*, 2012).

Outro estudo realizado com a administração de curcumina em células infectadas por HCV *in vitro* constatou discreta inibição da replicação viral em genótipos 1 e 2, e atividade inibitória significativa sobre a entrada do vírus na célula. Não se observou o desenvolvimento de resistência por mutação, resultante do tratamento com curcumina. Acredita-se que a curcumina afetou a fluidez vírion-membrana, impedindo a ligação e fusão do HCV ao hepatócito (ANGGAKUSUMA *et al.*, 2014).

A baixa biodisponibilidade e rápida degradação na circulação sanguínea são obstáculos no efeito terapêutico da curcumina e, portanto, diversas estratégias têm sido estudadas para potencializar sua ação, como o uso de formulações de nanocápsulas, lipossomas, complexos fosfolipídicos, ou combinação com outros polifenóis, como a piperina (ANGGAKUSUMA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016; MUSSO; CASSADER; GAMBINO, 2016).

2.3.2. Piperina

A piperina é um alcaloide extraído da pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) ou da pimenta-longa (*Piper longum* L.), utilizada como condimento e em medicina ayurvédica por suas propriedades farmacológicas (CHEN, L.-C. *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 2012; SHOBA *et al.*, 1998; TAWANI *et al.*, 2016). Além disso, a piperina apresenta diversas atividades biológicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva, antimutagênica, antipirética, antitumoral e antiproliferativa (LAI *et al.*, 2012; TAWANI *et al.*, 2016).

Ochiai e colaboradores (2015) verificaram que a piperina estimula a expressão do gene de receptor de LDL (LDL-R) e a absorção de partículas de LDL em hepatócitos *in vitro*, e apresenta a capacidade de estimular a atividade de SREBPs.

A piperina tem a propriedade de aumentar a biodisponibilidade de outros fitoquímicos e fármacos, como o resveratrol e a rifampicina (TAWANI *et al.*, 2016). Isto ocorre através de interferência na glicuronidação hepática e intestinal, inibindo ambas glicoproteína-P, transportadora de fármacos, e CYP3A4, uma das principais enzimas metabolizadoras de fármacos (CHEN, L.-C. *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 2012; SHOBA *et al.*, 1998; TAWANI *et al.*, 2016).

Um estudo avaliou a capacidade da piperina de aumentar a biodisponibilidade de metformina e reduzir os níveis séricos de glicose em camundongos diabéticos, com resultados positivos no controle da glicemia, e uso potencial no tratamento de diabetes, para diminuição das doses medicamentosas administradas, de efeitos colaterais e do custo da terapia (ATAL *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm combinado a administração de piperina e curcumina, com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade e facilitar a absorção desta (RANDINO *et al.*, 2016; SHOBA *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2016).

Até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura que relacionem a piperina com o HCV.

2.3.3. Naringenina

A naringenina é uma flavanona presente em frutas cítricas como laranjas, limões e toranjas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). As frutas cítricas são fontes abundantes de flavonoides. A naringina é a substância precursora, que sofre hidrólise pela microbiota intestinal, originando metabólitos, como a forma aglicada naringenina, que é então absorvida no intestino. Naringina e naringenina são antioxidantes potentes, contudo a ação da naringina é menos acentuada porque sua fração glicosilada causa impedimento estérico ao grupo sequestrador de radicais livres (ALAM *et al.*, 2014).

Teng e colaboradores (2018) demonstraram que altas concentrações de naringenina apresentam forte efeito inibitório contra a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) fluorescentes. O acúmulo de AGEs no corpo pode aumentar a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs), e estimular macrófagos a produzir fatores inflamatórios excessivamente, como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), TNF- α e IL-1 β . Este efeito inibitório em AGEs pode ser atribuído à atividade antioxidante, ou à capacidade de reter espécies reativas de carbonila.

Estudos *in vitro* indicam efeitos da naringenina relacionados à redução da atividade de MTTP e das enzimas acil-CoA:colesterol aciltransferases ACAT1 e ACAT2, bem como à redução seletiva da expressão de ACAT2 em células de hepatocarcinoma HepG2, o que diminui a disponibilidade de lipídios para a montagem de lipoproteínas contendo apoB, podendo ser útil na prevenção de dislipidemias, resistência à insulina e aterosclerose (ALLISTER *et al.*, 2005; ASSINI *et al.*, 2013; MULVIHILL; HUFF, 2010; WILCOX *et al.*, 2001). Vários inibidores de MTTP que diminuem lipídios plasmáticos foram identificados, contudo não chegaram

ao uso clínico devido aos efeitos adversos associados principalmente ao acúmulo de lipídios no fígado (HUSSAIN; NIJSTAD; FRANCESCHINI, 2011).

A ação antiviral da naringenina foi descrita para o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o HCV (LYU; RHIM; PARK, 2005; SHIMIZU *et al.*, 2017). Goldwasser e colaboradores (2011) relataram a capacidade da naringenina de inibir a secreção de RNA e da proteína de capsídeo do HCV, sem alteração nos níveis virais intracelulares, sugerindo que sua atuação está relacionada a alguma etapa posterior à replicação, bloqueando a montagem de partículas virais infecciosas. No mesmo trabalho, foi observada a atividade inibitória da enzima MTTP, mediada pela ativação de PPAR- α .

2.3.4. Nobiletina

A nobiletina é uma flavona polimetoxilada encontrada em cascas de frutas cítricas, como a *Citrus depressa*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. nobilis*, *C. erythrosa*, *C. reticulate* e *C. limon*, com diversas propriedades fisiológicas e farmacológicas, entre elas proteção neural e cardiovascular, ação anti-inflamatória, antitumoral, antiedemência, antioxidante e regulatória do metabolismo lipídico e de glicose (LEE *et al.*, 2013; NOGUCHI *et al.*, 2016; TAKII *et al.*, 2017).

A nobiletina apresenta efeitos antidiabéticos, combinando as atividades insulínica e antiapoptótica em células β . Em estudo utilizando células INS-1D *in vitro*, Takii e colaboradores (2017) observaram que a nobiletina é capaz de prevenir a apoptose mediada por estresse do RE, através da diminuição dos níveis de fosforilação de JNK.

Em outro estudo, foi observado potencial antitrombótico, prevenindo que o LDL oxidado induzisse a expressão de fator tecidual funcional em células endoteliais, o que causaria mudança nas células para o fenótipo pró-trombótico. Esta atividade está relacionada ao efeito antioxidante, à capacidade de inibição do fator de transcrição NF- κ B, redução da produção de EROs e da peroxidação lipídica (CIRILLO *et al.*, 2017).

O tratamento com nobiletina ocasionou a biogênese de mitocôndrias em adipócitos 3T3-L1, estimulando fenótipo similar ao tecido adiposo marrom, com

aumento dos níveis de expressão de fatores de transcrição como C/EBP- β , PPAR- β/δ e PPAR- α (LONE; PARRAY; YUN, 2018).

Qi e colaboradores (2018) demonstram que a nobiletina está ativa principalmente no fígado, onde atua na regulação do metabolismo lipídico e de glicose, e reduz a resistência à insulina. Ela também estimula a fosforilação de AMPK, inibe a expressão de SREBP-1c e a fosforilação de ACC.

Estudos também apontam a inibição da secreção de apoB-100 em células HepG2 e a atenuação de obesidade induzida por dieta, bem como efeitos redutores de esteatose hepática, secreção de VLDL e dislipidemia, e aumento da oxidação de ácidos graxos hepáticos, em camundongos LDL-R-/- (HUANG *et al.*, 2016; MULVIHILL *et al.*, 2011). A nobiletina e alguns de seus metabólitos fazem parte de estudos prévios no grupo de pesquisa, nos quais foram obtidos resultados promissores em células Huh-7.5 quanto à atividade inibidora de MTTP, comparado a outros CNBs e metabólitos (GONÇALVES, 2016).

Em suma, no presente trabalho foi identificada a oportunidade de explorar os efeitos biológicos dos CNBs selecionados como um caminho para investigar e ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos nas etapas da replicação, a via de montagem e liberação da partícula viral em células SGR-JFH1, juntamente com o metabolismo lipídico da célula Huh-7.5 não-transfectada, na formação e secreção das partículas de VLDL a partir da ação da enzima MTTP, com a finalidade de possibilitar a descoberta de novos meios de interromper a infecção sem causar prejuízos ao organismo hospedeiro ou aumentar a barreira genética viral.

III. Objetivos

III. OBJETIVOS

Caracterizar as etapas finais da biossíntese do vírus da hepatite C concomitante ao metabolismo lipídico celular associado à formação e secreção das lipopartículas virais, e analisar os mecanismos moleculares em culturas provenientes de hepatocarcinoma humano, expressando ou não o *replicon* subgenômico do HCV, SGR-JFH1, quando submetidas aos tratamentos com os CNBs curcumina, piperina, naringenina e nobiletina.

Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade nas linhagens celulares.
- Avaliar a ação dos CNBs sobre a síntese de VLDL pela determinação da atividade da enzima MTTP *in vitro*.
- Estudar o efeito dos CNBs sobre o ciclo de replicação viral pela quantificação de mRNA genômico intra e extracelular.
- Avaliar os níveis de apoptose relacionados à infecção viral e ao tratamento com CNBs.
- Avaliar vias de sinalização celular envolvidas em estímulos proliferativos, apoptóticos e de metabolismo lipídico, nas células transfectadas ou não com o *replicon* subgenômico do HCV, decorrentes do tratamento com os CNBs.

IV. Material e Métodos

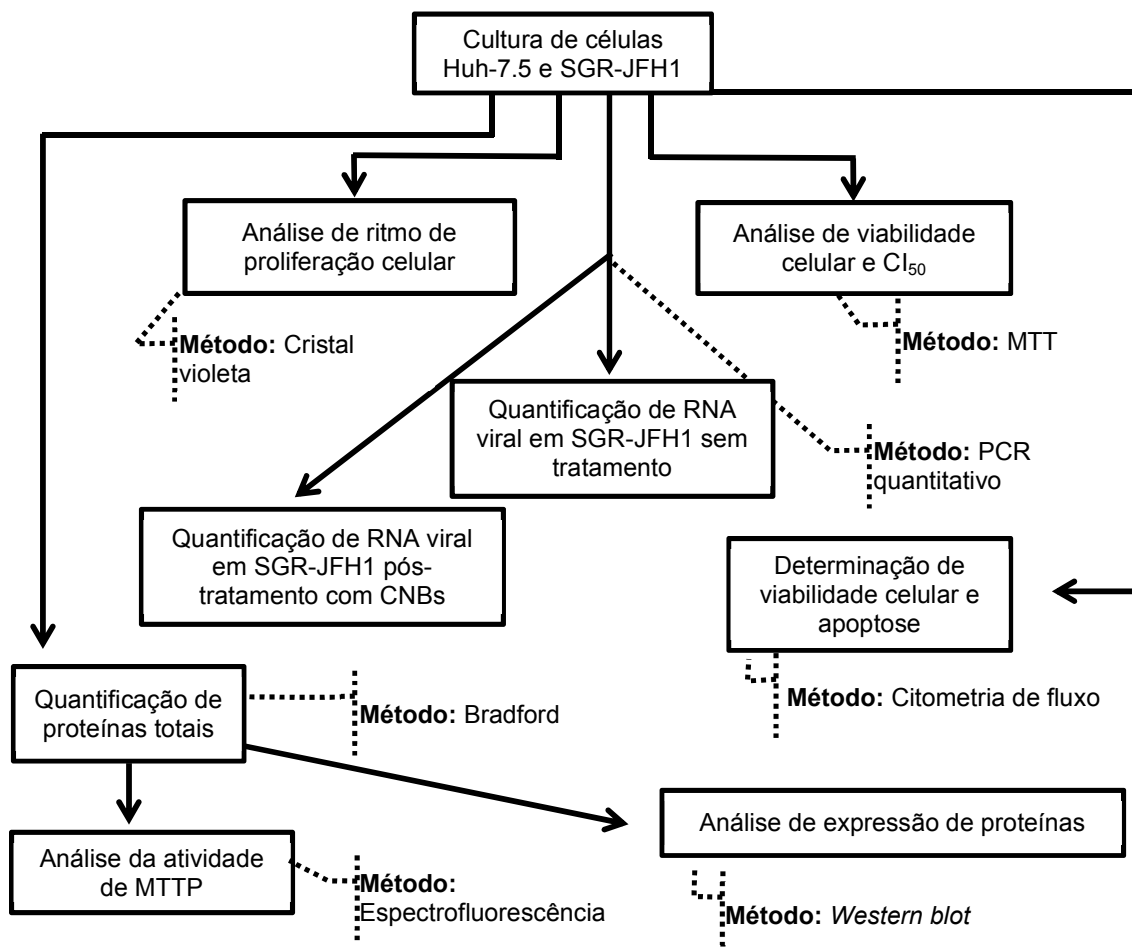
IV. MATERIAL E MÉTODOS

As células Huh-7.5 e Huh-7.5 expressando estavelmente o *replicon* subgenômico SGR-JFH1 (*Japanese fulminant hepatitis-1*, genótipo 2a) foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunologia Clínica, 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).

4.1. Delineamento experimental

Os experimentos foram executados conforme indicado no fluxograma apresentado na Figura 5.

Figura 5. Delineamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2. Compostos Naturais Bioativos

Os compostos naturais bioativos (CNBs) analisados foram: curcumina (CL, C1386), piperina 97% (PP, P49007) e naringenina (NG, N5893), todos estes adquiridos da Sigma Aldrich; a nobiletina (NOB) foi obtida a partir de resíduos destilados de óleo de laranjas prensadas a frio, parcialmente separada por cromatografia de coluna, posteriormente purificada por cromatografia líquida de fase reversa, e analisada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) conectado em paralelo com um espectrômetro de massa equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (HPLC-ESI-MS), como previamente descrito por Gonçalves e colaboradores (2018); e curcumina administrada simultaneamente com a piperina (CL/PP).

A análise dos efeitos dos CNBs foi dividida em grupos: grupo 1 (CL, PP e CL/PP); grupo 2 (NG); grupo 3 (NOB).

4.3. Cultura celular

As células Huh-7.5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM - Sigma D1152 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% solução de aminoácidos não essenciais (Sigma M7145), penicilina 10.000 U mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹, compondo o meio de cultura completo – DMEM-C. As células SGR-JFH1 com gene de resistência à neomicina foram cultivadas em meio DMEM-C contendo 500 µg mL⁻¹ de antibiótico seletivo geneticina (G418, Gibco, código 11811031). Ambas foram mantidas em estufa umidificada com 5% CO₂ a 37 °C, com troca do meio de cultura a cada 2 dias, e colhidas quando alcançada a concentração necessária para a realização dos experimentos com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma T4049), em solução salina de Hanks. A contagem de células foi realizada por coloração com azul de Trypan 0,2% (m/v) em PBS, em câmara de Neubauer ou Countess II FL *Automated Cell Count* (Thermo Fischer Scientific).

4.4. Proliferação celular pelo ensaio de cristal violeta

O ensaio de proliferação celular utilizando o corante cristal violeta foi realizado conforme metodologia descrita na literatura (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016; HENRIKSSON *et al.*, 2006), com algumas modificações. Este ensaio fundamenta-se na capacidade do corante cristal violeta em se ligar a proteínas e DNA. Desta forma, as células que permanecem aderidas às placas de cultura celular são coradas, enquanto as células mortas perdem a aderência e são, portanto, subtraídas da população de células viáveis. Este ensaio foi realizado em duplicata, em três experimentos independentes.

As células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura em concentração de $2,0 \times 10^4$ células mL^{-1} , em placas estéreis de poliestireno para cultivo celular, com 35 mm de diâmetro, e incubadas por períodos de 3 h, 1, 3, 5, 7 e 10 dias em estufa a 5% CO_2 e 37 °C. O branco de reação foi composto por DMEM. Durante o período de incubação o meio de cultura foi adicionado quando houve diminuição expressiva de volume em decorrência de evaporação. Após os períodos de incubação, o meio de cultura foi desprezado e 1 mL de etanol 70% foi adicionado, por 1 h. O etanol foi removido e 1 mL da solução de cristal violeta 0,5% em metanol em água ultrapura (1:4) foi acrescentado por 20 min, e as placas mantidas em agitação. Posteriormente, a solução foi removida e as placas lavadas com 1 mL de água ultrapura 5 vezes. Esta etapa foi seguida por secagem em temperatura ambiente, *overnight*. Por fim, acrescentou-se 1 mL por placa de metanol, em agitação, por 5 min, 100 μL foram transferidos para placa de 96 poços, e a absorbância correspondente foi medida em espectrofotômetro de microplacas (Fisher Scientific Accuskan GO) em comprimento de onda de 570 nm. Para as amostras em que a absorbância ultrapassou 1,5, foi realizada nova diluição em metanol, e o resultado matematicamente corrigido empregando a equação 1:

Equação 1:

$$Abs\ corrigida = Abs\ aferida \times [(V_i\ amostra + V\ adicionado)/V_i\ amostra]$$

sendo $V_i\ amostra$ o volume inicial de amostra e $V\ adicionado$ o volume de diluente, o metanol, adicionado.

4.5. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A análise de viabilidade das células para determinar a concentração em que os CNBs apresentam citotoxicidade, bem como calcular a concentração inibitória média (CI_{50}) foi realizada por ensaio colorimétrico de MTT seguindo a metodologia descrita na literatura (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987), com algumas modificações padronizadas no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular – FCFAr, UNESP, Araraquara.

A citotoxicidade foi analisada em ensaios preliminares pelo método de coloração de proteínas com sulforrodamina B (SRB), que é baseado na capacidade do corante SRB em ligar-se eletrostaticamente e de forma dependente do pH em resíduos de aminoácidos básicos de células fixadas com ácido tricloroacético. Contudo, os resultados obtidos não apresentaram reprodutibilidade (dados não apresentados), e por esta razão o ensaio por MTT foi adotado. Esta metodologia, por sua vez, fundamenta-se na atividade de desidrogenases mitocondriais de células viáveis que reduzem metabolicamente o sal de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (sal de MTT, de coloração amarela e solúvel em água), em cristais de formazan (cor azul-púrpura e insolúvel em água), que se acumulam no citoplasma celular. Assim, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

As suspensões de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 foram preparadas em meio de cultura em concentração de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} , em placa de cultura celular de 96 poços de fundo plano, distribuídas em volume de 100 μL /poço, incubadas em estufa umidificada a 5% CO_2 e 37 °C por 24 h. Depois deste período, o meio de cultura foi removido e as células tratadas com os CNBs nas seguintes concentrações: CL, PP e NOB: de 1,56 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$; NG 1,95 a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$; CL/PP em proporções 3:1, 20:1, 6:1 e 1:3 (vide Apêndice I), estas combinações de concentração determinadas com base em dados descritos na literatura (ARCARO *et al.*, 2014; ATAL *et al.*, 2016; SAMA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016). As células foram novamente incubadas por 24 h, seguindo as mesmas condições anteriores. Então, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados uma vez com PBS e adicionou-se 100 μL /poço de solução de MTT a 2 mg mL^{-1} em meio DMEM incompleto, com outra incubação por mais 3 h. Por fim, a solução de MTT foi removida e foram pipetados 100 μL /poço de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma D4540);

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

A média aritmética da absorbância do branco (*Branco*) foi subtraída das médias dos tratamentos com CNBs e dos controles. Os valores foram calculados conforme a equação 2.

Equação 2:

$$VC (\%) = \frac{([\text{CNBs}] - \text{Branco})}{\text{CN}} * 100$$

Os testes foram realizados em quadruplicata, em três ensaios independentes. Também foram realizados ensaios para verificar se apenas os CNBs, diluídos em DMSO na mais alta concentração em que foram preparados, seriam diretamente capazes de reduzir o sal de MTT, neste caso, durante o período total de ensaio os CNBs não exibiram reatividade (dados não apresentados).

4.6. Quantificação de RNA viral

A quantificação de RNA do HCV foi realizada nas células SGR-JFH1 sem e após tratamento com os CNBs ou controle de veículo, para a determinação do ritmo normal de transcrição e do potencial de inibição da replicação viral pelos compostos. Neste ensaio, a preparação das amostras foi realizada de forma automatizada, utilizando micropartículas magnéticas para purificar os ácidos nucleicos.

A análise de qPCR fundamenta-se em ciclos térmicos repetidos, alternando temperaturas de incubação, para que os produtos de amplificação dissociem em fitas simples em temperaturas mais altas, permitindo 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 derivada da bactéria Gram negativa *Thermus thermophilus*, e é realizada a 56 °C, de acordo com o tamanho dos *amplicons*. A

etapa de extensão é combinada com uma etapa de anelamento. Os *primers* reversos do HCV e do controle interno (CI) anelam aos respectivos alvos, e são estendidos durante um período prolongado de incubação. Em seguida há uma etapa de desnaturação, à temperatura de 90-95 °C, 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, a temperatura é reduzida a 35 °C para permitir a detecção de fluorescência. As sondas do HCV 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'. Na ausência de sequência alvo na amostra, a fluorescência é reprimida pelo *quencher*. Na presença da sequência alvo de HCV ou do CI, a hibridização da sonda às sequências complementares separa o fluoróforo-*reporter* do *quencher*, e permite a emissão e detecção de fluorescência. As sondas de HCV e CI são marcadas com diferentes fluoróforos, permitindo a detecção simultânea, em apenas uma reação *multiplex*, de ambos os produtos amplificados a cada ciclo. O ciclo em que o sinal fluorescente da sonda de HCV é detectado é proporcional ao log da concentração de RNA do HCV presente na amostra original.

A sequência alvo do HCV é a região 5' UTR do RNA genômico, que é específica e altamente conservada, e os *primers* são projetados para hibridizar com esta região evitando divergência entre os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. O CI é constituído por uma sequência de RNA sem relação com a sequência alvo do HCV, obtida a partir do gene hidroxipiruvato redutase da abóbora (*Cucurbita pepo* – Abbott Molecular).

Uma curva de calibração é necessária para a quantificação do RNA do HCV nas amostras e controles. Esta curva é construída pelo log da concentração de HCV versus o *cycle threshold* (C_T) em que o sinal fluorescente é inicialmente detectado, e é armazenada e utilizada posteriormente para os cálculos de concentração das amostras. A cada análise, os controles negativo, positivo alto e positivo baixo também são incluídos para a validação do processo.

4.6.1. Células sem tratamento

Este estudo foi realizado com a finalidade de determinar a quantidade de RNA viral presente no sobrenadante da cultura celular de SGR-JFH1 durante o período de até 10 dias, medido em log de unidades internacionais por mL (log UI mL⁻¹). Para isto, as células SGR-JFH1 foram plaqueadas em DMEM-C com G418 em concentração de $2,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, 1 mL/poço, em placa para cultivo celular de 24 poços, incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por períodos de 3 h, 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Após o período de incubação o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos tipo *ependorf* a -80 °C até a etapa de extração e amplificação do RNA viral, de acordo com a metodologia descrita no item seguinte para as células com tratamento.

4.6.1. Células pós-tratamento com CNBs

As células SGR-JFH1 foram plaqueadas em meio de cultura em concentração de $5,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, 300 µL/poço, em placas para cultivo celular de 48 poços e incubadas em estufa a 5% CO₂ e 37 °C por 24 h. Depois, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com os CNBs diluídos em meio DMEM-C G418 nas concentrações de 5, 10, 20 e 100 µmol L⁻¹, e o controle de veículo (CV), constituído por células em DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura. As células foram então incubadas por 24 h, 3 e 7 dias seguindo as condições anteriores. Decorridos os respectivos períodos de incubação, os tratamentos foram coletados e armazenados a -80 °C, as placas lavadas com uma vez com PBS, e as células desprendidas da placa por ação de tripsina, seguido pela adição de 200 µL/poço de meio DMEM incompleto. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo *ependorf*, que foram centrifugados em centrífuga Eppendorf 5415D a 300 ×g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células armazenado a -80 °C, até o momento da análise, quando 900 µL de tampão de lise foram adicionados.

A metodologia para quantificação do RNA do HCV foi realizada segundo as instruções do fabricante, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., para o ensaio Abbott RealTime HCV (<https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv->

[package-insert.pdf](#)) e iniciou-se pela extração automática no equipamento Abbott m2000sp, de 600 μL de ácidos nucleicos das amostras de sobrenadante ou células lisadas, empregando micropartículas ferromagnéticas. O CI foi diluído juntamente com o tampão de lise e processado simultaneamente a cada amostra. Após as etapas de captura do RNA pelas partículas magnéticas e lavagens para remover moléculas não ligadas, o material genético foi eluído e o master mix, constituído por oligonucleotídeos do HCV incluindo sonda e *primers*, enzima rTth polimerase termoestável e reagente de ativação, foi adicionado. Então, as placas óticas de reação de 96 poços foram seladas e transferidas ao equipamento Abbott m2000rt para as reações de transcrição reversa, amplificação por reação em cadeia de polimerase, detecção de fluorescência e quantificação de RNA. Este ensaio segue a padronização da Organização Mundial da Saúde (OMS), de acordo com o Segundo Padrão Internacional para RNA do HCV, e apresenta limite de detecção de 12 UI mL^{-1} e limite superior de quantificação de 100 milhões de UI mL^{-1} .

4.7. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada para os ensaios de análise de atividade de MTTP e de *western blot*, a partir de lisado celular em concentrações e tampões específicos, descritos na metodologia de cada ensaio separadamente.

O método de Bradford empregado fundamenta-se na formação do complexo corante-proteína em condições ácidas, nas quais o Coomassie G-250 reage com os resíduos de aminoácidos arginina, lisina, histidina, tirosina, triptofano e fenilalanina em proteínas, resultando em alteração de cor de marrom para azul, com absorbância máxima a 595 nm.

O reagente de Bradford foi preparado a 1 mg mL^{-1} de azul de Coomassie G-250 em ácido fosfórico 85% (v/v) e 25 mL de etanol absoluto, e o volume final ajustado para 500 mL com água deionizada. O ensaio foi realizado em microplaca, com volume final de 260 μL . Para a curva padrão, fez-se inicialmente uma solução estoque de albumina bovina (*BSA: bovine serum albumin*) 1 mg mL^{-1} em água. Depois foi feita a diluição seriada com fator de diluição 2 em 5% (v/v) do tampão de lise celular (composição descrita no ensaio correspondente) em água, com a finalidade de determinar se algum dos componentes do tampão produzia interferência na determinação da concentração proteica. O volume de 250 μL de

reagente de Bradford e 10 μL de cada concentração de albumina foi pipetado em triplicata em poços de microplaca. A partir da equação da reta obtida, as concentrações das amostras foram determinadas e ajustadas posteriormente.

4.8. Atividade de MTTP por fluorescência

O ensaio de atividade da proteína microssomal transferidora de triglicérides (MTTP) baseia-se na utilização de substratos doadores e aceptores de fluorescência que permitem a detecção da transferência mediada por MTTP de lipídios neutros, o que resulta em aumento da intensidade de fluorescência. O *kit* de atividade de MTTP (Sigma-Aldrich, MAK110) foi utilizado a partir da preparação de suspensões de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 em placa de cultura celular de 24 poços de fundo plano, contendo 1×10^6 células mL^{-1} , em volume de 500 μL /poço. As placas foram inicialmente incubadas a 37 °C, em estufa umidificada com 5% de CO_2 , por 24 h. Em seguida, o meio foi removido e as células tratadas com os CNBs a 10 ou 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ baseado nos resultados obtidos na quantificação de carga viral, e incubadas por períodos de 1 e 7 dias. Para o controle de veículo (CV) empregou-se células em DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura. Posteriormente, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 150 μL /poço de tampão de lise resfriado (Tris 10 mmol L^{-1} pH 7,4; NaCl 150 mmol L^{-1} ; 1 mmol L^{-1} EDTA, e os inibidores de protease fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 100 mmol L^{-1} e leupeptina 1 mg mL^{-1}). As células foram lisadas em sonicador Vibra-Cell (Sonics & Materials, Inc.), por 3 ciclos de 5 s, em gelo, e as proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford.

A curva padrão para o ensaio de atividade de MTTP foi preparada empregando como ponto inicial apenas isopropanol, e 5 μL de partícula doadora de fluorescência em isopropanol em diluição seriada (1:2), 100 μL /poço, com excitação em 465 nm e emissão em 535 nm.

As amostras de lisado celular após o tratamento com os CNBs foram preparadas incubando 100 μg de proteína total celular em 4 μL de partícula doadora e 4 μL de partícula aceptora, 182 μL de tampão de ensaio (do *kit*), em volume final de 200 μL , em placa negra, em estufa de microplacas a 37 °C por 9 h. O sinal de fluorescência foi medido segundo os mesmos parâmetros anteriores, em espectrofluorímetro (Biotek Synergy H1, Software-Gen5).

4.9. Análise de apoptose por citometria de fluxo

O protocolo anexina V e iodeto de propídeo (PI) é frequentemente utilizado para determinar a apoptose, necrose ou viabilidade celular a partir das características de integridade e permeabilidade da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose, um dos primeiros eventos é a exteriorização da fosfatidilserina de membrana, e a anexina V apresenta alta afinidade por esta molécula, permitindo a identificação de apoptose em estágios iniciais. Em células necróticas, a anexina V acessa toda a membrana plasmática, pois nestas células a membrana está rompida. O PI, por sua vez, é um corante fluorescente nuclear, que se liga ao DNA em células mortas ou em estágios tardios de apoptose; assim, o PI é um indicador de exclusão de viabilidade celular, também 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 simultaneamente, 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 viabilidade celular e apoptose 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 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. Depois, o meio de cultura foi removido e foram adicionados os tratamentos com os CNBs diluídos em meio, nas concentrações de 10 ou 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ baseado nos resultados obtidos na quantificação de carga viral, o controle de veículo (CV) constituído por DMSO 0,1% (v/v) em meio de cultura, e o controle positivo H_2O_2 0,1 mmol L^{-1} como indutor de apoptose (XIANG *et al.*, 2016). As células foram então incubadas por 24 h seguindo as condições anteriores. Posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi coletado em tubo tipo *eppendorf* devidamente identificado. Os poços foram lavados com PBS, as células 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. Foram

realizadas duas lavagens com PBS gelado, seguidas de centrifugação. As células foram suspensas em 100 μL de tampão de ligação diluído 1:10 em água ultrapura, do *kit* de detecção de apoptose anexina V FITC I (BD Pharmigen, código 556547), transferidas para tubo de 5 mL de fundo redondo para citometria. Foram adicionados 3 μL de anexina V a cada tubo, incubando por 15 min no escuro. O volume final foi ajustado para 350 μL com tampão de ligação, e 3 μL de iodeto de propídeo (PI) foram adicionados imediatamente antes da análise, realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences), com captura de dados utilizando o programa CellQuest Pro 6.0, e análise de dados com FlowJo versão X 10.0.7r2. A leitura para anexina V-FITC foi realizada no canal FL1 (530/30 nm) e para o PI no canal FL3 (670 nm).

4.10. Determinação de proteínas associadas à sinalização celular por *western blotting*

Os níveis de expressão e fosforilação de proteínas por *western blotting* foi realizada a partir do cultivo de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 em placa de 6 poços, 5×10^6 células/poço, incubadas por 24 h, e então tratadas com os CNBs nas concentrações calculadas, correspondentes à concentração inibitória 10% (CI_{10}) e 20% (CI_{20}), em que a morte celular foi observada em apenas 10 ou 20% das células e, portanto, são consideradas não-citotóxicas, segundo a ISO 10993-5 (VIDAL; GRANJEIRO, 2017), por mais 24 h. Após este período, as células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com 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 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EDTA; triton X-100 0,1% (m/v); deoxicolato de sódio 0,05% (m/v)], inibidores de proteases (PMSF a 1 mmol L^{-1} ; leupeptina a 42 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 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}).

Após a lise, as amostras foram separadas em alíquotas e congeladas a -80°C até o momento do uso, e uma alíquota foi separada para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Posteriormente, 100 μg de proteínas totais de cada amostra foram separados por eletroforese em SDS-PAGE 8 a 15%, dependendo da massa molecular da proteína alvo. Como marcador de massa molecular foi utilizado SeeBlue Plus2 (Invitrogen, LC5925).

A transferência das proteínas do gel para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno, Hybond-P, Amershan, 0,45 μm) foi realizada em tampão de transferência [Tris-HCl 48 mmol L^{-1} pH 8,3; glicina 39 mmol L^{-1} ; metanol 20% (v/v); SDS 0,0375% (m/v)], por 2 h 30 min, e amperagem constante calculada por área da membrana (cm^2) $\times$ fator 0,8, em sistema de transferência semiseco. Após a transferência, as membranas foram incubadas *overnight* em tampão de bloqueio [BSA 3% em tampão de lavagem TBS-T: 20 mmol L^{-1} de Tris-HCl pH7,6, NaCl 150 mmol L^{-1} e 0,1% Tween 20 (v/v)], sob agitação constante a 4 °C. Depois as membranas foram novamente incubadas nas mesmas condições com anticorpos primários específicos: anti-Bcl-2 (código 4223), anti-Bax (2774), anti-Caspase-3 clivada adjacente ao Asp175 (9664), anti-FoxO-3a (12829), anti-FoxO-3a fosforilada em Ser253 (13129), anti-Akt1 (2938), anti-Akt1 fosforilada em Ser473 (4051), anti-AMPK- α (5832), anti-AMPK- α fosforilada em Thr172 (50081), e como controle interno o anticorpo de proteína constitutiva anti-GAPDH (2118). Para os anticorpos produzidos em coelho, foi utilizado o anticorpo secundário anti-coelho IgG (H+L) biotilado (14709) e para o anticorpo primário produzido em camundongo (anti-Akt1 fosforilada) foi utilizado anti-camundongo biotilado (14708), em concentração 1:5000. Todos estes anticorpos foram adquiridos de Cell Signaling Technology. Também foram testados os anticorpos primários anti-SREBP-1 (SAB4502850) e anti-SREBP-1 fosforilada em Ser439 (SAB4301449), de Sigma-Aldrich, Inc. Após a incubação nos anticorpos primários, as membranas foram lavadas 4 $\times$ por 5 min em tampão de lavagem, e então incubadas em anticorpo secundário por 24h, sob agitação, a 4 °C. Após este período, as membranas foram novamente lavadas e incubadas em conjugado avidina-peroxidase (Abcam AB59653), 1:5000, por 30 min em temperatura ambiente, sob agitação. Para a revelação, empregou-se o *kit* de substrato quimioluminescente Pierce ECL (Thermo Scientific, 32106). Em alguns casos, foi realizado o procedimento de *mild stripping*, a retirada do anticorpo ligado para reutilização da membrana na quantificação de outra proteína, no qual, após a detecção de sinal, a membrana é submetida a 2 lavagens por 10 min com tampão de remoção (0,2 mol L^{-1} glicina; 0,1% SDS (m/v); 1% Tween 20 (v/v), pH 2,2), seguido por 2 lavagens em PBS por 10 min e 2 lavagens por 5 min em TBS-T e, para verificar a eficácia da remoção dos anticorpos, uma nova revelação. Então, esta membrana foi novamente lavada em TBS-T por 5 min, bloqueada, incubada nos anticorpos e revelada, seguindo o mesmo método descrito

anteriormente. O sinal quimioluminescente foi detectado pelo equipamento C-Digit Blot Scanner e a intensidade das bandas foram estimadas utilizando o programa LICOR Image Studio Digits v. 5.2.

A expressão proteica das vias de sinalização celular foi estudada quanto ao efeito dos tratamentos com os CNBs, calculado a partir dos resultados observados nas células SGR-JFH1, ou seja, nas células expressando o HCV, em relação aos hepatócitos não-transfectados, as células Huh-7.5, com o objetivo de determinar se a presença do vírus apresentou alteração na expressão proteica e se os tratamentos foram capazes de alterar o efeito produzido. Para obter o nível relativo de expressão de proteínas, inicialmente o sinal de cada concentração foi dividido pelo sinal do controle constitutivo interno (GAPDH) da respectiva linhagem celular, para minimizar as variações relativas ao procedimento experimental. Os tratamentos foram então relacionados ao CV, correspondente à expressão proteica na célula sem tratamento, de forma a isolar o efeito das diferentes concentrações dos CNBs nas vias de sinalização. Nos casos em que tanto a proteína nativa quanto sua correspondente fosforilada tiveram quantidades detectáveis, foi feita a relação para determinar a condição de fosforilação. Por fim, para isolar o efeito do CNB na célula transfectada com o HCV, foi feita a relação entre o resultado em células SGR-JFH1 por Huh-7.5.

4.11. 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.). Consideraram-se estatisticamente significativos os efeitos cujo *p*-valor foi inferior ou igual a 0,05.

No ensaio de proliferação celular por cristal violeta, 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 tipos celulares e aos diferentes tempos de incubação pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$ em todas as análises). O pressuposto de homogeneidade de variância, avaliado pelo teste de Levene evidenciou homogeneidade quanto ao tipo de célula ($p > 0,05$) e heterocedasticidade quanto ao tempo de incubação ($p \leq 0,001$). Neste caso, optou-se por realizar a ANOVA com

correção matemática de Welch, seguido pelo pós-teste de Games-Howell, que não assume variâncias ou tamanho da amostra iguais.

Para avaliar a progressão regular da carga viral sem a interferência de tratamentos, foi realizada a análise estatística aplicando *one-way* ANOVA ($p \leq 0,001$), seguida do pós-teste de Tukey HSD. O pressuposto de normalidade de distribuição da variável dependente (carga viral) nos diferentes tempos de incubação foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$), indicando distribuição normal dos resultados. O pressuposto de homogeneidade de variância foi avaliado pelo teste de Levene ($p \leq 0,001$), contudo, considerando que o *design* do experimento é balanceado, com mesmo n de amostras para cada grupo observado (tempos de incubação), que as médias dos grupos não estão linearmente relacionadas às próprias variâncias e que não foram observados *outliers*, considerou-se que a ANOVA é robusta à heterocedasticidade de variâncias observada, sem a necessidade de recorrer a transformações matemáticas corretivas (MARÔCO, 2014).

Para avaliar o efeito dos tratamentos com CL, PP e CL/PP sobre a carga viral relativa total das células SGR-JFH1, calculado como índice da razão entre o resultado dos tratamentos com os CNBs e o CV, foram analisados simultaneamente fatores como o tempo de incubação, diferentes concentrações e a localização da quantificação do RNA (sobrenadante ou ambiente intracelular), foi realizada a análise estatística *one-way* ANOVA ($p \leq 0,01$), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. O pressuposto de normalidade foi avaliado por Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$). Para o pressuposto de homogeneidade de variâncias foi empregado Levene, com homocedasticidade em relação às variáveis tratamento e concentração, contudo, em relação à localização, o resultado de carga viral apresentou heterogeneidade ($p \leq 0,01$). A análise foi realizada de forma independente em relação ao tempo de incubação, e, portanto, não se considerou necessário aplicar correções matemáticas à ANOVA.

Para avaliar se os diferentes parâmetros empregados de linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1 e, conseqüentemente, a presença do vírus da hepatite C, além dos tempos de incubação, dos tratamentos com CL, PP e CL/PP e das concentrações administradas influenciariam significativamente a atividade da enzima MTTP (variável dependente quantitativa), utilizou-se a análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$), seguida de teste *post-hoc* de Tukey HSD. Os pressupostos deste

método, a normalidade da distribuição das médias e a homogeneidade das variâncias entre os grupos analisados, foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$) e Levene, com homocedasticidade em relação a todas as variáveis analisadas ($p > 0,05$).

No ensaio de apoptose considerando os tratamentos com CL, PP e CL/PP, os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$) e Levene, com variâncias homogêneas ($p > 0,05$) em relação aos tratamentos nas células Huh-7.5, porém heterogêneas ($p \leq 0,05$) para as SGR-JFH1. Ainda assim, empregou-se *one-way* ANOVA ($p < 0,05$), seguida de pós-teste de Tukey, por ser considerada suficientemente robusta, conforme parâmetros anteriormente descritos, sem a necessidade de aplicar correções matemáticas.

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade para a determinação de níveis de expressão de proteínas após os tratamentos com CL, PP e CL/PP foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p < 0,05$) e Levene, com variâncias homogêneas ($p > 0,05$) em relação aos tratamentos, porém heterogêneas ($p < 0,05$) para as proteínas analisadas. Neste caso foi empregado o teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Para a quantificação de carga viral por qRT-PCR após tratamento com NG em diferentes concentrações e tempos de incubação, o pressuposto de normalidade da distribuição das médias foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$), e o homocedasticidade por Levene ($p > 0,05$). Então, foi aplicada a análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$ para 1 e 7 dias, e $p > 0,05$ para 3 dias), seguida de teste *post-hoc* de Tukey HSD.

Para avaliar como o tratamento com NG em concentrações de 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ afeta a atividade da enzima MTTP nas linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1 em tempos de incubação de 1 e 7 dias, utilizou-se a análise de variância *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$), seguida de teste *post-hoc* de Tukey HSD. O pressuposto de normalidade da distribuição das médias foi validado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$), e o de homogeneidade das variâncias por Levene ($p > 0,05$).

A análise de apoptose de células marcadas com anexina V-FITC após tratamento com NG ou indutor de morte celular (H_2O_2 , 1 mmol L^{-1}) foi realizada empregando a análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$), seguida de teste

post-hoc de Tukey HSD. O pressuposto de normalidade da distribuição das médias foi validado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$), e o de homogeneidade das variâncias por Levene ($p > 0,05$).

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade após o tratamento com NG na determinação dos níveis de expressão de proteínas foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p < 0,05$) e Levene, com variâncias homogêneas ($p > 0,05$) em relação aos tratamentos com os CNBs, porém heterogêneas ($p < 0,05$) para as proteínas analisadas. Neste caso foi empregado o teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

No ensaio de quantificação de carga viral após tratamento com NOB, o pressuposto de normalidade da distribuição das médias foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p < 0,01$ para 1 dia, $p \geq 0,05$ para 3 e 7 dias), e o de homogeneidade das variâncias por Levene ($p \geq 0,05$). Foi empregada a análise de variância *one-way* ANOVA ($p \geq 0,05$ para 1 e 7 dias, $p < 0,01$ para 3 dias), seguida de teste *post-hoc* de Tukey HSD.

O ensaio de atividade de MTTP após tratamento com NOB foi realizado utilizando a análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$), seguida de teste *post-hoc* de Tukey HSD. O pressuposto de normalidade da distribuição das médias foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p \geq 0,05$), e o de homogeneidade das variâncias por Levene, com homocedasticidade em relação às variáveis analisadas ($p \geq 0,05$).

A análise de apoptose após tratamento com NOB foi realizada empregando a análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$), seguida de teste *post-hoc* de Tukey HSD. O pressuposto de normalidade da distribuição das médias foi validado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$), e o de homogeneidade das variâncias por Levene ($p > 0,05$).

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade na determinação dos níveis de expressão de proteínas após o tratamento com NOB foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S $p > 0,05$) e Levene, com variâncias homogêneas ($p > 0,05$) em relação aos tratamentos com os CNBs, porém heterogêneas ($p < 0,05$) para as proteínas analisadas. Neste caso, a análise dos níveis de expressão proteica entre as diferentes proteínas investigadas foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

V. Resultados e Discussão

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

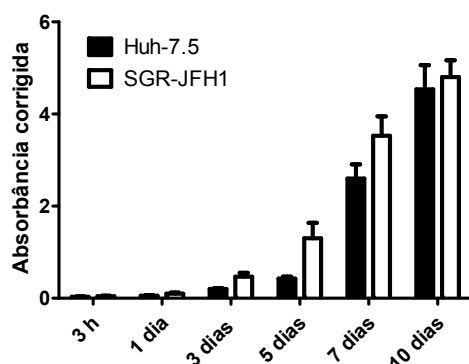
Neste trabalho os resultados encontram-se divididos da seguinte maneira: dos subitens **5.1** a **5.5**, apresentamos os resultados relativos aos experimentos que não envolveram diretamente o tratamento com os CNBs, realizados com a finalidade de delinear e nortear a qualidade e confiabilidade dos experimentos posteriores, e depois em 3 seções, por tratamentos, com o objetivo de analisar a ação dos compostos nos grupos, como segue: grupo 1 (CL, PP e CL/PP); grupo 2 (NG); grupo 3 (NOB).

5.1. Proliferação celular pelo ensaio de cristal violeta

O intuito deste ensaio foi avaliar o ritmo de proliferação celular das linhagens Huh-7.5 e SGR-JFH1 quando plaqueadas sem a interferência de tratamentos com os compostos, e, desta forma, observar o comportamento das células no espaço de até 10 dias, quando submetidas exclusivamente a condições de estresse pela ausência da troca de meio de cultura.

A Figura 6 apresenta o resultado de ritmo de crescimento das células estudadas, e o Apêndice II mostra o *p-valor* considerado estatisticamente significativo entre tratamentos.

Figura 6. Análise de proliferação celular pelo método de coloração com cristal violeta para as linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.



Fonte: Elaborado pela autora.

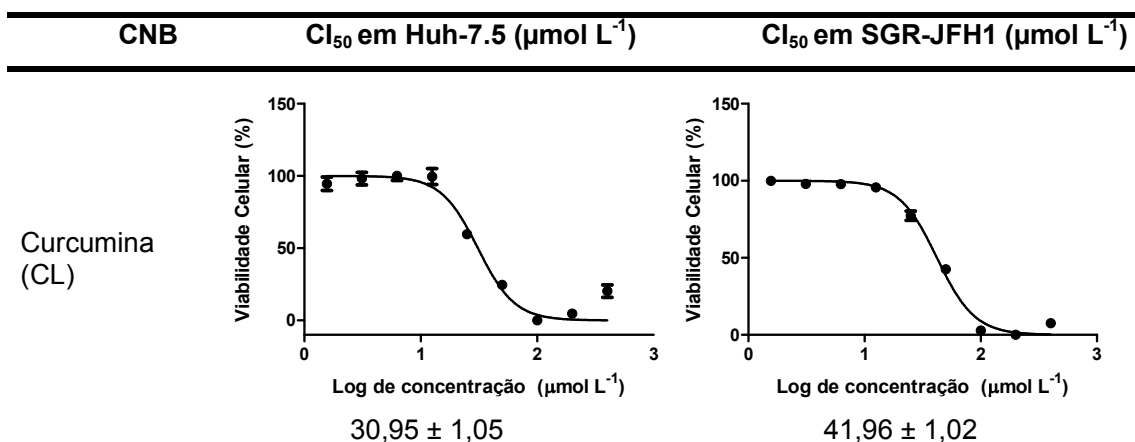
Legenda: Ensaio de cristal violeta em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após períodos de incubação de 3 h, 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$).

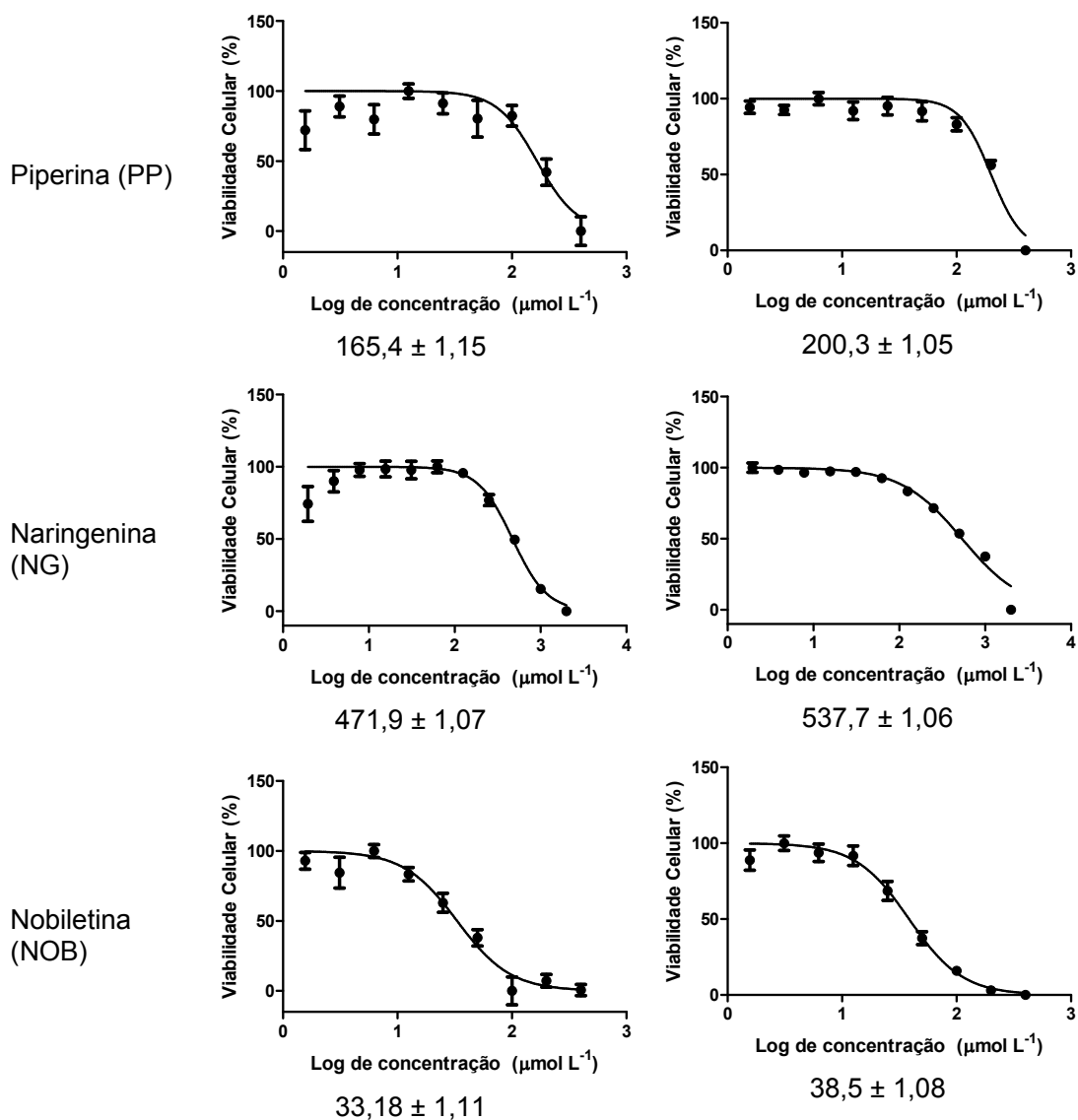
É possível observar que as duas linhagens não apresentaram diferenças significativas de proliferação celular em mesmo período de incubação. Além disso, ambas exibiram crescimento contínuo sem que a fase de declínio fosse atingida na duração do ensaio. Desta forma, pode-se inferir em estudos posteriores que a constatação de morte celular acentuada durante até 10 dias de incubação não estaria diretamente relacionada com o ritmo de proliferação das células, sendo então resultante de algum outro fator externo, como a citotoxicidade decorrente de algum tratamento empregado.

5.2. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT

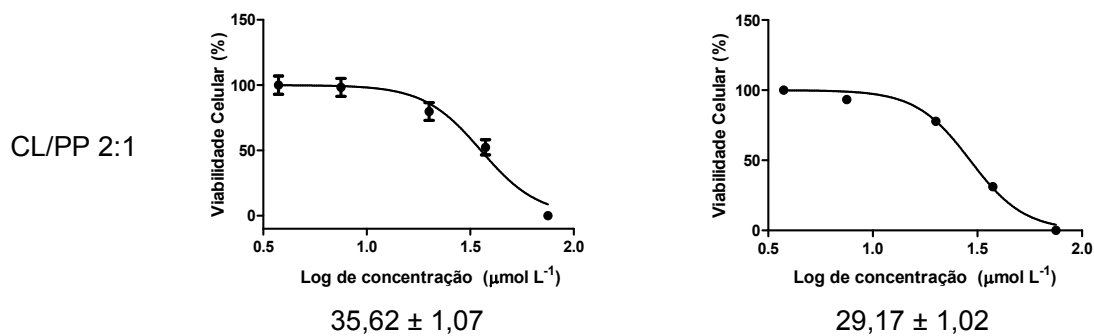
Os valores calculados de CI_{50} foram expressos na Tabela 1. A análise da administração concomitante de CL/PP em proporção 5:1 e 1:2 em ambas as linhagens celulares originou resultados ambíguos, ou mesmo não foi possível calcular a CI_{50} . Nas proporções 2:1 e 20:1 os resultados foram próximos e, desta forma, selecionou-se a proporção 20:1 para os ensaios posteriores, com base em trabalhos encontrados na literatura (ATAL *et al.*, 2016; SHOBA *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2016).

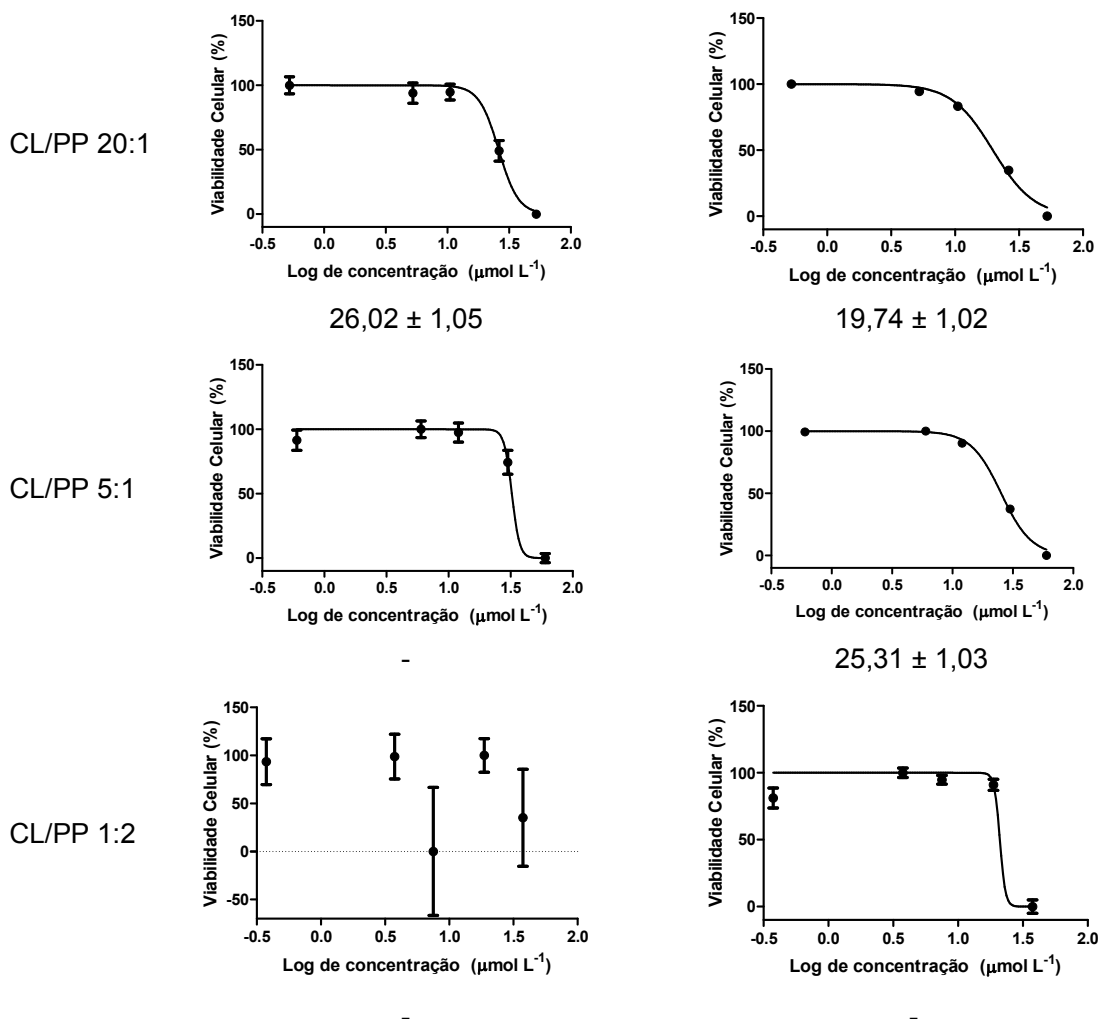
Tabela 1. Concentração inibitória média dos compostos naturais bioativos para as linhagens celulares Huh-7.5 e SGR-JFH1.





Curcumina e piperina (CL/PP)



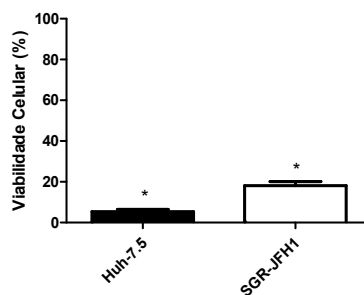


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de MTT em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após período de incubação de 24 h. - : IC_{50} não calculada.

O controle positivo (H_2O_2 a 1 mmol L^{-1}) foi mantido em incubação pelo mesmo período que os tratamentos com CNBs, e apresentou expressiva citotoxicidade, como pode ser observado na Figura 7.

A morte celular calculada nas células SGR-JFH1 foi de aproximadamente 80%, enquanto nas células Huh-7.5 a viabilidade celular média foi de aproximadamente 5%. Este resultado respalda o emprego do H_2O_2 como controle de morte celular nos experimentos posteriores.

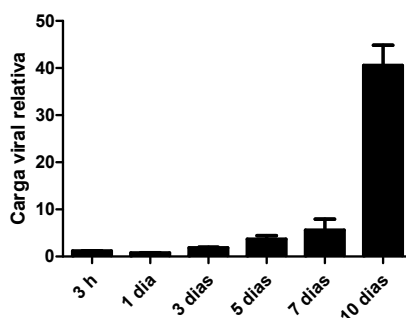
Figura 7. Viabilidade celular das células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com H₂O₂.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Controle positivo para o ensaio de MTT após período de incubação de 24 h. * $p \leq 0,001$

5.3. Quantificação de RNA viral

A quantificação da carga viral em células SGR-JFH1 sem a interferência de tratamentos indica que o HCV replica-se de forma significativa quando mantido em cultura celular, seguindo a mesma tendência observada no ensaio de proliferação celular, possivelmente devido à capacidade replicativa do vírus, e ao aumento da população de células, que não foram submetidas a cuidados de troca de meio ou passagens por ação de tripsina no período observado. A Figura 8 exibe o efeito do tempo de incubação na quantificação de RNA viral.

Figura 8. Análise quantitativa por qRT-PCR da carga viral de RNA do HCV em sobrenadante de células SGR-JFH1.

Fonte: Elaborado pela autora.

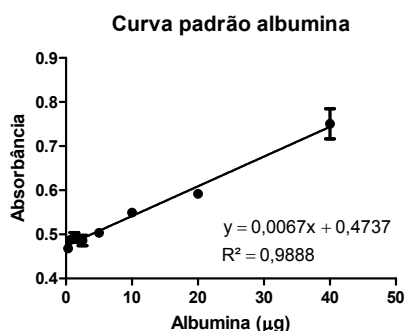
Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para determinação de RNA do HCV em células SGR-JFH1, após incubação por 3 h, 1, 3, 5, 7 e 10 dias, em relação à carga viral presente no sobrenadante da garrafa de cultura celular antes do plaqueamento..

O teste *post-hoc* HSD de Tukey para as diferenças estatisticamente significativas foi apresentado no Apêndice III. O RNA viral apresenta diferença significativa a partir do 5º dia de incubação comparado a 1 dia, em relação ao sobrenadante da cultura celular em garrafa antes do plaqueamento. O aumento da carga viral ocorre de forma constante e progressiva, até aproximadamente o 7º dia de incubação, em que a diferença se torna acentuada. Por este motivo, para os experimentos posteriores o período máximo de análise manteve-se em até 7 dias de incubação.

5.4. Quantificação de proteínas totais

A Figura 9 apresenta a curva padrão obtida para a quantificação de proteínas totais no lisado celular para a análise da atividade de MTTP, e que foi semelhante à quantificação realizada para o ensaio de *western blot*. A partir da equação da reta, considerando um coeficiente de correlação R^2 de 0,9888, fez-se a determinação da concentração de proteínas totais nas amostras de lisado celular dos diferentes tratamentos para os ensaios acima mencionados.

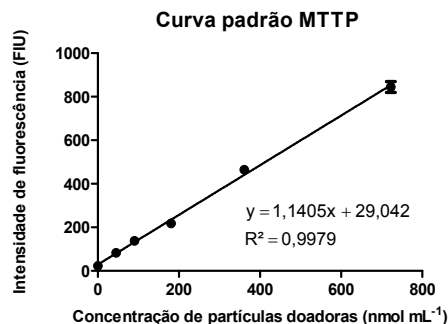
Figura 9. Curva padrão de albumina bovina utilizada para o cálculo da concentração de das proteínas totais no lisado celular.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.5. Atividade de MTTP

A curva padrão para o ensaio de atividade de MTTP está demonstrada na Figura 10, obtida a partir da concentração inicial de partículas doadoras de 289 nmol mL⁻¹.

Figura 10. Curva padrão do ensaio de atividade de MTTP.

Fonte: Elaborado pela autora.

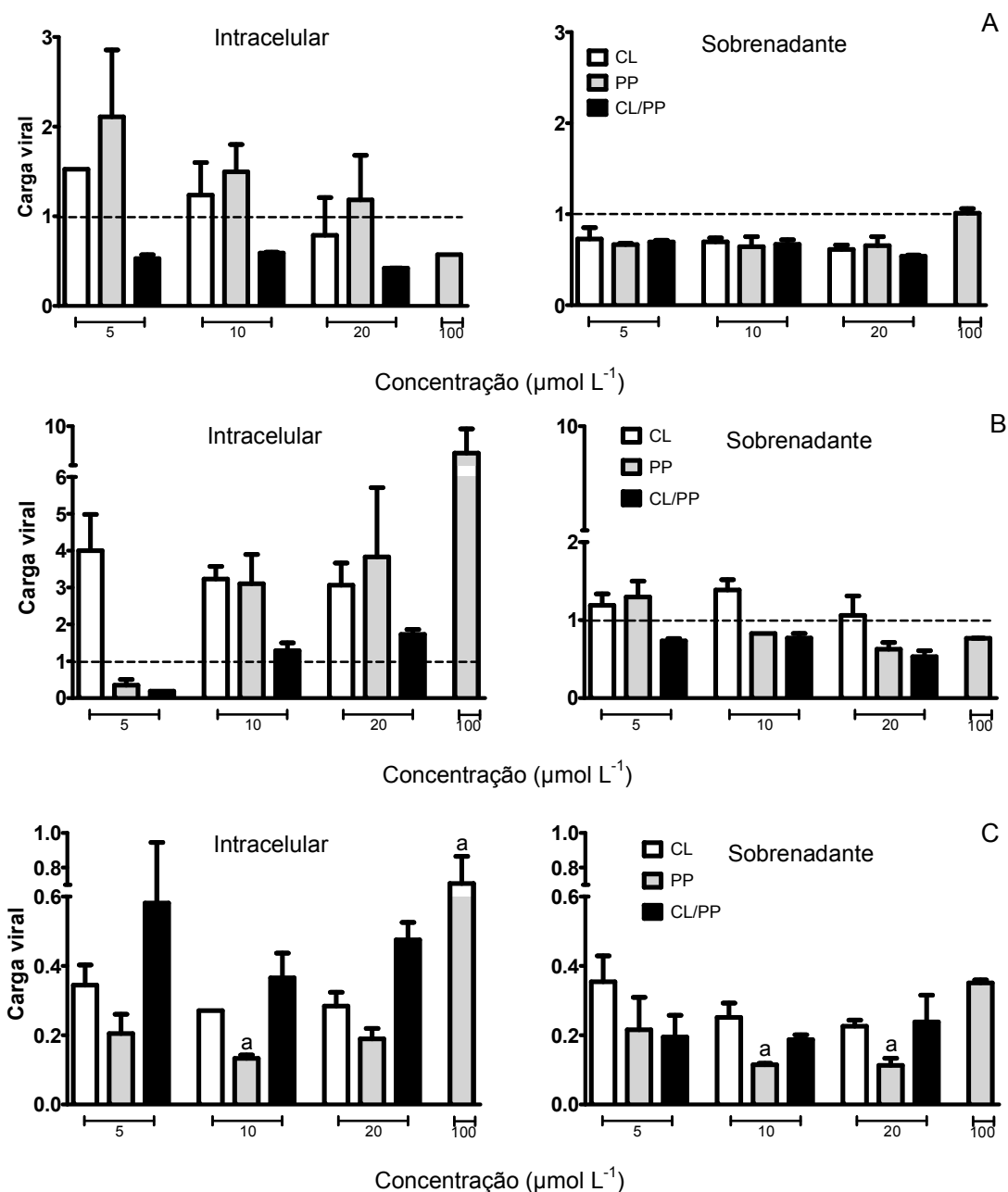
A enzima MTTP ativa, presente no lisado celular, transfere o substrato lipídico neutro marcado com fluoróforo de uma molécula doadora para uma aceptora, com emissão de fótons detectada como aumento da intensidade de fluorescência. A partir da equação da reta obtida na curva padrão calibração, apresentando o coeficiente de correlação R^2 de 0,9979, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a intensidade de fluorescência captada, normalizada pelo valor obtido no controle de veículo (CV).

Grupo 1. Curcumina, Piperina e Curcumina concomitante à Piperina

5.6. Quantificação de RNA viral

É possível observar na Figura 11A que em 1 dia de incubação, o tratamento com CL/PP entre as concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve inibição da síntese viral intracelular, com resultado de índice de carga viral (média $\pm$ desvio padrão) de $0,51 \pm 0,08$ em relação ao CV, enquanto para a PP foi de $0,58 \pm 0,005$, mas apenas a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os outros tratamentos não demonstraram efeitos inibitórios no meio intracelular. No sobrenadante, entretanto, à exceção de PP a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, os tratamentos apresentaram desempenho significativo, com carga de aproximadamente $0,65 \pm 0,09$ em média geral. No Apêndice IV estão exibidos os resultados de diferença estatisticamente observada entre tratamentos. Apenas a PP a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou diferença evidente em relação a vários outros tratamentos, devido à carga relativa mais que duas vezes superior à carga do controle.

Figura 11. Índice de carga viral de RNA do HCV em meio intracelular e sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com CL, PP e CL/PP.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para quantificação de RNA do HCV, com resultado em índice de carga viral a partir da relação tratamento por controle de veículo (CV), realizado em células SGR-JFH1. **A, B, C:** períodos de incubação de 1, 3 e 7 dias, respectivamente. A escala de carga viral foi mantida entre gráficos de resultados em meio intracelular e sobrenadante para facilitar a comparação. *a:* $p < 0,05$.

Na Figura 11B, após 3 dias de incubação PP e CL/PP em $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram em torno de $0,27 \pm 0,16$, em média, de carga viral em relação ao CV, no meio intracelular. Ao mesmo tempo, PP e CL/PP (exceto PP a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) exibiram efeitos inibitórios em diferentes concentrações, em média $0,71 \pm 0,12$, entre si, de partículas virais liberadas no sobrenadante. As diferenças estatísticas observadas entre tratamentos estão indicadas no Apêndice V. Assim, neste período, apesar de apresentar alta síntese viral, estes tratamentos influenciaram a inibição da liberação do vírus no meio extracelular.

Em relação à incubação de 7 dias, os resultados foram muito expressivos, com inibição observada em todos os tratamentos, tanto da síntese viral quanto da liberação para o sobrenadante. As diferenças significativas foram indicadas diretamente na Figura 11C, e relacionam o resultado observado pelo tratamento com a PP a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, com $0,71 \pm 0,22$ de índice de carga viral no meio intracelular, com outros tratamentos que tiveram efeitos inibitórios notáveis, a PP a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio intracelular, e a 10 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sobrenadante, abaixo de 0,15.

Excetuando, portanto, este resultado em concentração mais alta da PP ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), os outros tratamentos do meio intracelular em 7 dias de incubação, em conjunto, exibiram uma média de índice de carga viral de $0,32 \pm 0,19$, enquanto que no sobrenadante esta média foi de $0,22 \pm 0,10$. Desta forma, é possível perceber o importante efeito inibitório que os CNBs CL, PP e CL/PP exerceram sobre a síntese e liberação da lipopartícula viral do HCV, após períodos mais prolongados de tratamento, com grande potencial terapêutico complementar, que pode ser mais minuciosamente investigado, principalmente em conjunto com as terapias já estabelecidas.

Os efeitos antivirais de CL constituem um viés relevante de estudo. Kim e colaboradores (2010) testaram a atividade de CL em faixa de concentração de 5 a $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ em células Huh-7 expressando um *replicon* subgenômico de HCV, e observaram redução da atividade luciferase do *replicon* marcado para aproximadamente 40% em relação ao controle. Em outro trabalho, foi observada uma redução de 50% do RNA-HCV após tratamento com CL, na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, em células Huh-7.5 expressando o *replicon* subgenômico 1b, marcado com luciferase (CHEN, M. H. *et al.*, 2012).

Ainda utilizando CL em concentrações de 5 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ no tratamento de células Huh-7.5 expressando diferentes genótipos de HCV marcados com luciferase,

foi demonstrada a inibição da entrada do vírus na célula, realizada por transfecção ou eletroporação, contudo nenhum efeito inibitório foi observado nas etapas de replicação, montagem ou liberação (ANGGAKUSUMA *et al.*, 2014).

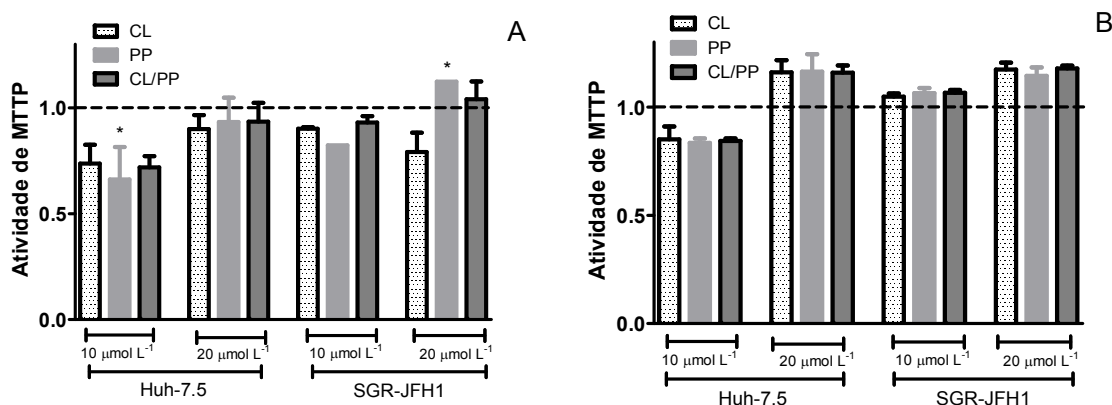
Os resultados obtidos neste trabalho são significativos, principalmente considerando a tendência observada até 10 dias de aumento contínuo da carga viral, no ensaio de qRT-PCR sem tratamentos. Avaliando a duração completa do ensaio, percebe-se que o desempenho de PP e CL/PP foi superior ao de CL isoladamente. Portanto, é possível que esta observação esteja relacionada ao aumento da biodisponibilidade de CL pelo uso concomitante da PP, cujos resultados isoladamente também foram igualmente promissores e inéditos, considerando que até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que analisassem o efeito antiviral de PP sobre o HCV.

A relação entre biodisponibilidade da CL e seu desempenho foi descrita por diversos autores (ANGGAKUSUMA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016; MUSSO; CASSADER; GAMBINO, 2016). Este efeito é decorrente da baixa solubilidade em água, e é observado principalmente em administração oral, considerando a via completa do metabolismo e absorção da CL (ASSIS *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2016).

5.7. Atividade de MTTP

Os resultados obtidos no ensaio de atividade de MTTP estão mostrados na Figura 12. É possível observar que, em 1 dia de incubação (Figura 12A), houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre o tratamento a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ com PP nas células Huh-7.5 e o tratamento com o mesmo composto a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas SGR-JFH1, com atividade estimulada neste último em relação ao controle. Isto indica que, em concentrações iguais, os tratamentos não alteram significativamente a ação enzimática, e que a presença do vírus tampouco causa aumento significativo na atividade da MTTP.

Figura 12. Índice de atividade de MTTP por fluorescência em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 tratadas com CL, PP e CL/PP.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Análise da atividade de MTTP em lisado celular das linhagens Huh-7.5 e SGR-JFH1 com resultado em índice de atividade relativa de MTTP, calculado a partir intensidade de fluorescência de cada tratamento (FIU) em relação ao CV (DMSO 0,1%). **A:** e **B:** incubação por 1 e 7 dias, respectivamente. * $p < 0,05$.

De forma geral, é possível perceber que nas células Huh-7.5, em 1 dia de incubação, a enzima apresentou índice de atividade (média $\pm$ desvio padrão) reduzida pela ação de CL, PP e CL/PP em 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com atividade média de $0,74 \pm 0,12$; $0,66 \pm 0,22$ e $0,72 \pm 0,07$, respectivamente. Neste mesmo período, de forma menos acentuada, também houve inibição nos tratamentos em 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (média geral $0,92 \pm 0,10$) e, em SGR-JFH1, os tratamentos em 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (média geral $0,88 \pm 0,05$), juntamente com CL em 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,79 \pm 0,13$). Após 7 dias de incubação, a inibição da atividade enzimática foi observada apenas nas células Huh-7.5, para os tratamentos a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (média geral $0,84 \pm 0,04$). Isto pode ser interessante no tratamento de dislipidemias, como em casos de hipercolesterolemia familiar, e poderia ser avaliado quanto ao desempenho no emprego simultâneo a outros medicamentos inibidores de MTTP, como a lomitapida (ELLIS *et al.*, 2016), ou estratégias que incluam o uso de estatinas, que são inibidores de HMG-CoAR e, portanto, reduzem a síntese de colesterol (CHARLTON-MENYS; DURRINGTON, 2008; PARHOFER, 2016).

No período de incubação de 7 dias percebe-se uma tendência à estimulação da atividade da enzima MTTP, nos tratamentos a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nas células Huh-7.5. A

média geral dos resultados dos tratamentos com índice de atividade MTTP/controle maior que 1 foi de $1,16 \pm 0,06$. Consequentemente, é possível inferir que os tratamentos com CL, PP e CL/PP podem facilitar a estimulação da ação da enzima MTTP em determinadas condições. As diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos estão demonstradas no Apêndice VI.

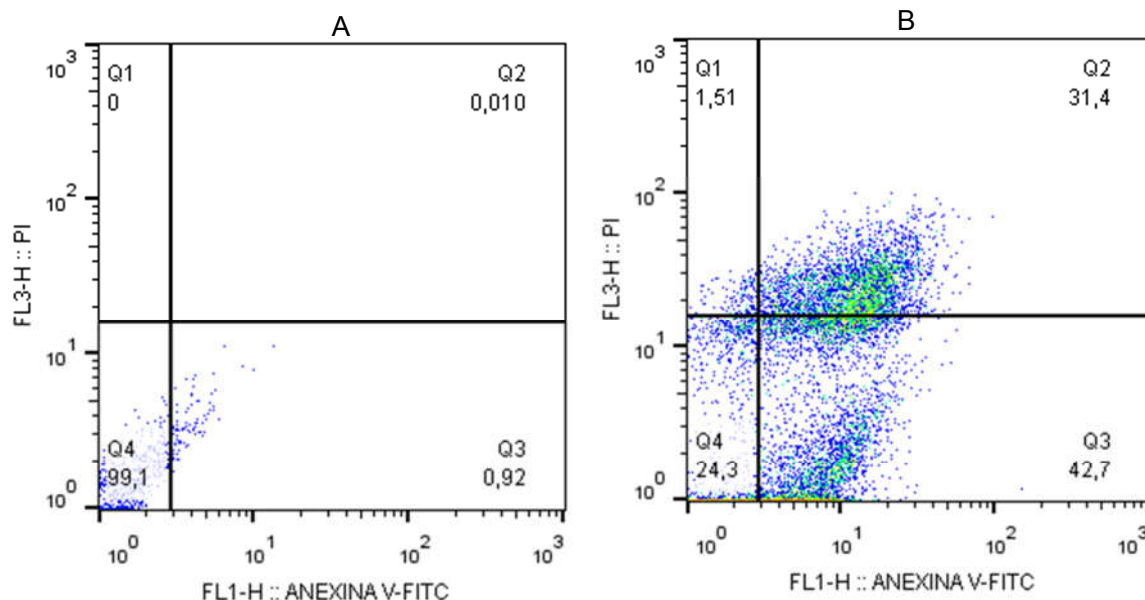
Desta forma, os resultados permitem argumentar que na célula infectada pelo HCV a atividade de MTTP continua aumentada após os tratamentos, considerando que a enzima é fundamental para a secreção de novas lipopartículas virais, e, neste caso, os CNBs estudados não exercem efeito inibitório imediato. Sendo assim, é possível inferir que a redução da carga viral observada previamente não está diretamente relacionada à atividade de MTTP.

5.8. Análise de apoptose

Os processos de morte celular podem ser classificados em necrose ou apoptose. A diferença morfológica entre os eventos inclui a diminuição celular, a picnose e o surgimento de corpos apoptóticos no processo de apoptose, enquanto que na necrose as células sofrem ruptura de membrana, juntamente com o aumento da célula e do núcleo (SHIN *et al.*, 2015).

A membrana plasmática celular é composta por lipídios assimetricamente distribuídos que formam as camadas externa e interna, direcionadas para o ambiente extracelular e para o citoplasma, respectivamente. A fosfatidilserina é um fosfolípido restrito à interface interna da membrana de células íntegras, contudo, a inversão e consequente exposição ao ambiente externo ocorrem durante o processo de apoptose, facilitando sua ligação à anexina V conjugada a FITC, com emissão de fluorescência verde (CROWLEY; MARFELL; SCOTT; WATERHOUSE, 2016). Após perder a integridade, a membrana torna-se permeável, e é então que o PI penetra a célula e intercala-se ao DNA, indicando o processo necrótico a partir da emissão de fluorescência vermelha (RIEGER *et al.*, 2011).

A Figura 13 exemplifica a análise de apoptose por citometria de fluxo.

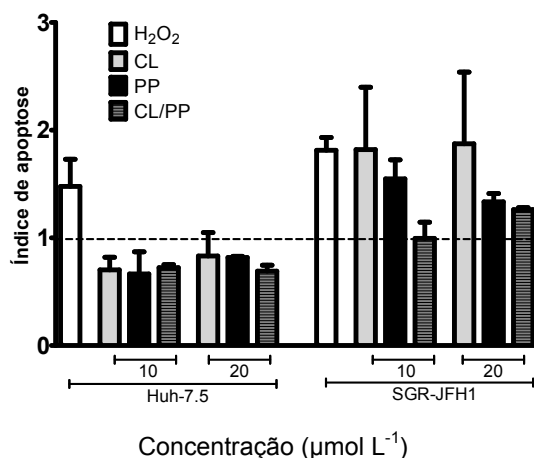
Figura 13. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Exemplo de gráfico de pontos em análise por citometria de fluxo. O quadrante 1 (Q1) corresponde à população de células marcadas apenas por PI (PI+V-), consideradas células necróticas; Q2 são células duplamente marcadas por anexina V e PI (PI+V+), que são as células em apoptose tardia; Q3 são marcadas apenas por anexina V (PI-V+), ou seja, em estágio inicial de apoptose; e Q4 são células não marcadas (PI-V-), ou viáveis. (A) Células SGR-JFH1 (controle de veículo), não marcadas; (B) Células SGR-JFH1 pós-tratamento com CL a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Na Figura 14 é possível observar a tendência à inibição da apoptose pelos tratamentos com os CNBs nas células Huh-7.5, em relação ao CV, com média geral do índice ($\pm$ desvio padrão) de $0,74 \pm 0,15$ para as concentrações testadas. Nas células SGR-JFH1, a tendência pós-tratamento com CNBs foi de indução de apoptose, em média $1,57 \pm 0,50$ em níveis similares ao controle de indução de morte, o H_2O_2 ($1,81 \pm 0,17$), exceto por CL/PP a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, que apresentou atividade similar ao CV. Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Este resultado demonstra que, no período observado, os tratamentos não exerceram influência significativa sobre a apoptose em ambas as linhagens celulares.

Figura 14. Análise do índice de apoptose em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com CL, PP e CL/PP.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de apoptose celular por citometria de fluxo relativa ao CV.

A atividade antitumoral da CL foi previamente descrita, relacionada à capacidade de indução de apoptose em diferentes linhagens celulares, incluindo células HL-60 de leucemia humana, células tronco de hepatocarcinoma humano e alguns subtipos específicos de esplenócitos (AGGARWAL; DEB; PRASAD, 2015; WANG, J.; WANG; BU, 2018; ZHOU *et al.*, 2016). Esta atividade está relacionada à interferência em diversos alvos moleculares, como na cascata de sinalização de NF-κB e STAT3 (ZHOU *et al.*, 2016).

Shiu e colaboradores (2013) demonstraram a capacidade da CL em induzir a apoptose e inibir a viabilidade celular em células Huh-7, proporcionalmente à dose administrada. Neste mesmo estudo, verificaram que em células expressando o HCV, a proteína do capsídeo viral é capaz de inibir o efeito da CL sobre a indução de apoptose.

A PP, por sua vez, foi testada em células HeLa (Henrietta Lacks), de câncer cervical humano, e estas células resistentes à mitomicina-C (HeLa/MMC), e apresentou um efeito significativo de estimulação de apoptose em ambas as linhagens (HAN *et al.*, 2017)

É possível que alterações nas concentrações ou tempo de incubação exacerbasse o efeito observado neste experimento, acentuando a tendência apresentada de indução de apoptose em células SGR-JFH1. Estas concentrações foram escolhidas com base no efeito inibitório sobre a carga viral. A indução de

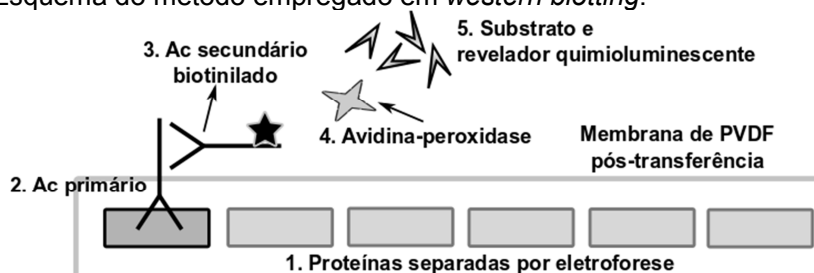
apoptose nestas células seria notável, considerando que a maquinaria viral se utiliza da célula para sua replicação e liberação com posterior infecção de células circunjacentes e consequente retorno à corrente sanguínea. Ainda mais vantajoso seria que este efeito de indução da apoptose em células não infectadas não se reproduzisse, e esta tendência também foi observada nas células Huh-7.5, desta forma restringindo-se à presença do HCV. Portanto, o uso de CL, PP e da combinação CL/PP apresenta um potencial a ser explorado com maior profundidade quanto ao efeito de indução de apoptose de células infectadas com o HCV, a partir dos dados obtidos neste trabalho.

5.9. Determinação de níveis de expressão de proteínas por *western blotting*

Western blotting é um método semiquantitativo de avaliação do nível de expressão de proteínas. O sistema empregado, esquematizado na Figura 15, consistiu no anticorpo primário, específico para cada uma das proteínas de interesse, ligado ao anticorpo secundário biotilado, que por sua vez se liga à molécula de avidina funcionalizada com peroxidase. O sinal emitido pela reação do substrato com revelador quimioluminescente catalisado pela peroxidase é proporcional à quantidade de proteínas inicialmente presentes na amostra, e é detectado pelo sistema de documentação, o *scanner* de membranas.

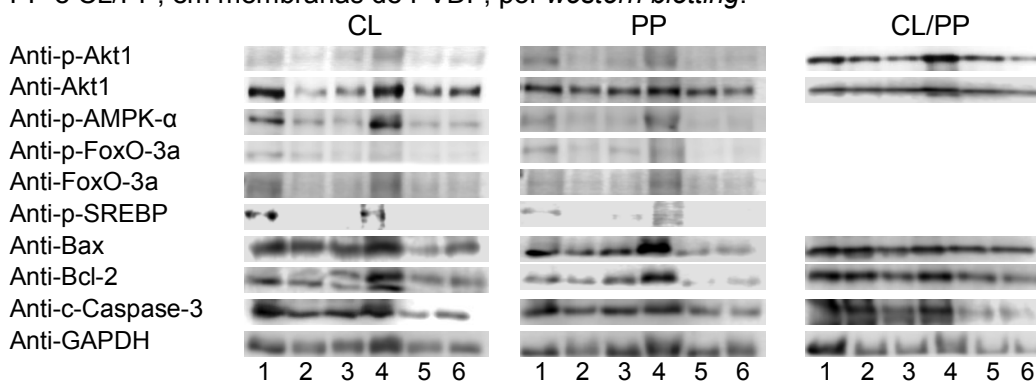
Os estudos de determinação dos níveis de expressão de proteínas realizados neste trabalho foram preliminares, com a intenção de desenhar um panorama geral dos efeitos dos CNBs sobre as vias de sinalização e metabolismo selecionados.

As concentrações testadas para os tratamentos com os CNBs seguiram os valores de concentração inibitória de 10 e 20% das células Huh-7.5 e SGR-JFH1, conforme Apêndice VII, considerando que a finalidade do estudo foi estudar o efeito dos tratamentos, sem provocar efeitos citotóxicos simultaneamente e, portanto, respeitando os parâmetros de citotoxicidade aceitáveis em estudos biológicos *in vitro*, conforme mencionado anteriormente.

Figura 15. Esquema do método empregado em *western blotting*.

Fonte: Elaborado pela autora.

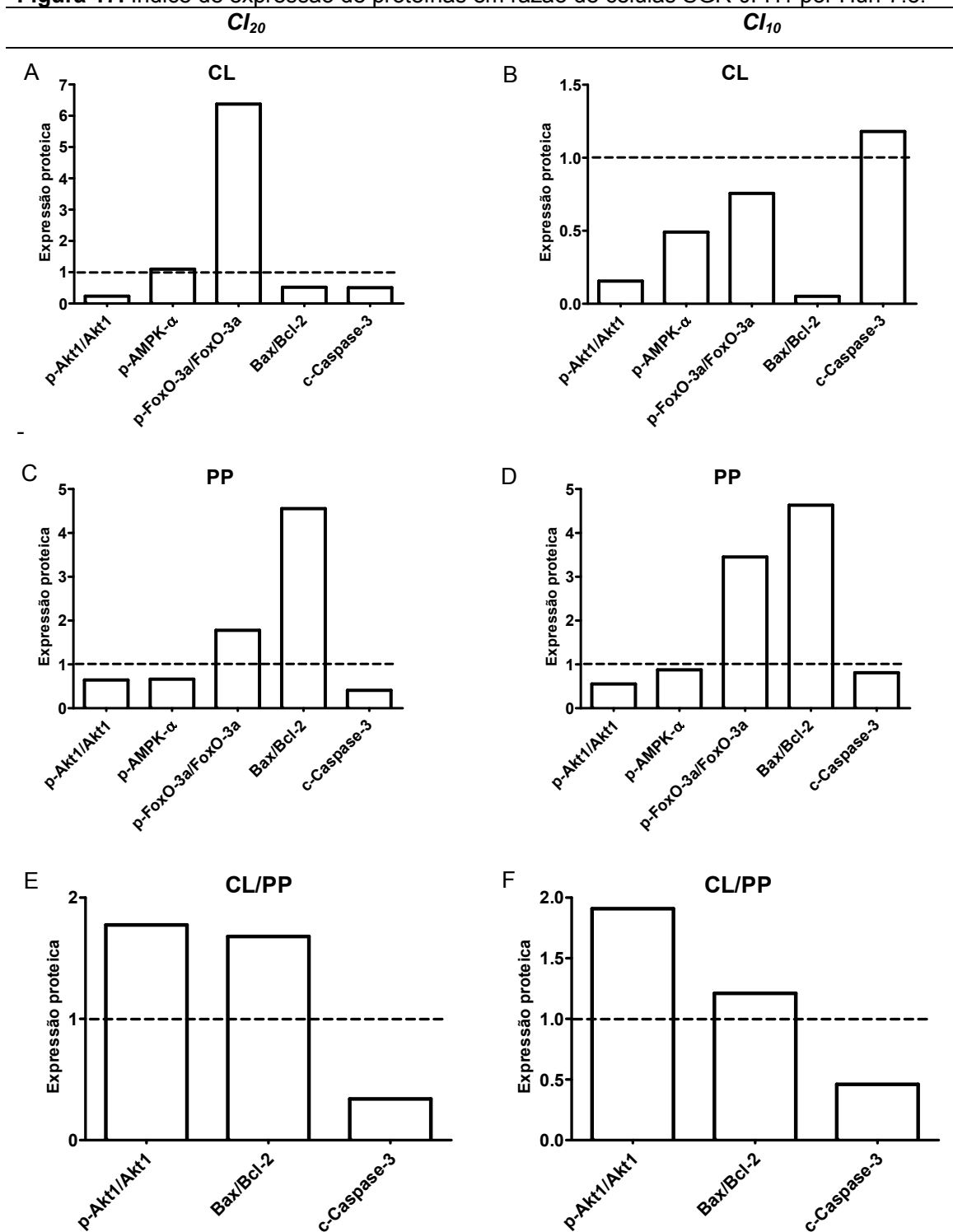
Na Figura 16 foram demonstradas as imagens capturas por *scanner* das membranas de *western blotting*, após a revelação de reação quimioluminescente, para as proteínas de interesse. Algumas proteínas não apresentaram níveis detectáveis por esta técnica.

Figura 16. Expressão proteica em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 após tratamento com CL, PP e CL/PP, em membranas de PVDF, por *western blotting*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em células Huh-7.5: (1) Controle de veículo; (2) Tratamento em Cl_{20} ; (3) Tratamento em Cl_{10} . Em células SGR-JFH1: (4) Controle de veículo; (5) Tratamento em Cl_{20} ; (6) Tratamento em Cl_{10} .

Na Figura 17 estão representados os níveis de expressão relativa das proteínas de interesse, calculadas pela razão SGR-JFH1/Huh-7.5.

Figura 17. Índice de expressão de proteínas em razão de células SGR-JFH1 por Huh-7.5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Relação SGR-JFH1/Huh-7.5, com resultados normalizados -pelo CV (controle de veículo). (A), (C) e (E) CI₂₀: concentração inibitória a 20% de morte e (B), (D) e (F) CI₁₀: concentração inibitória a 10% de morte celular após tratamento com CNBs.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o tratamento com CL em Cl_{20} causou discreto aumento da via de fosforilação de AMPK- α nas células SGR-JFH1, em comparação às células sem o vírus, assim como ao CV. Ao mesmo tempo, a fosforilação de Akt1, a relação Bax/Bcl-2 e o índice de Caspase-3 clivada apresentaram-se inibidos pela ação desta concentração de CL. A fosforilação de FoxO-3a em relação à proteína nativa teve um índice de estimulação acentuado. No tratamento em Cl_{10} , apenas a Caspase-3 clivada apresentou-se pronunciadamente expressa, e as outras vias inibidas. Por fim, a fosforilação de SREBP foi detectada apenas nas amostras de CV, o que sugere sua inibição mediante o tratamento com CL.

A AMPK funciona como um sensor energético em células, ativado em resposta à diminuição na disponibilidade de energia, indicada pela razão ATP/ADP ou ADP/AMP, que promove a mudança no metabolismo de forma a aumentar o catabolismo e reduzir o anabolismo pela fosforilação de proteínas-chave em diversas vias, como a via de homeostase lipídica, a via glicolítica e a homeostase mitocondrial. AMPK também regula a ativação de determinados genes relacionados ao metabolismo, autofagia e função lisossomal, como é o caso da estimulação da transcrição de FoxO-3 em situação de estresse energético, que resulta na ativação de genes de autofagia (HERZIG; SHAW, 2018).

Em células infectadas com HCV, a fosforilação de AMPK encontra-se inibida, enquanto que a fosforilação de Akt é estimulada (MANKOURI *et al.*, 2010). Desta forma, ainda que sutil, a estimulação da fosforilação de AMPK em células infectadas pode ser um efeito útil no tratamento da doença.

A ativação de AMPK suprime a lipogênese e acarreta em inativação de SREBPs. Corroborando os resultados observados neste trabalho, o tratamento com CL atuou na modulação da via AMPK-SREBP em hepatócitos de ratos (LIU, ZHEN *et al.*, 2017).

Os fatores de transcrição FoxO desempenham um papel importante na regulação positiva de genes-alvo associados à longevidade, à resistência ao estresse oxidativo, à interrupção do ciclo celular, à autofagia, à apoptose e ao metabolismo. No controle de proliferação celular e gliconeogênese, os fatores de transcrição FoxO e a Akt atuam antagonicamente. Quando a atividade de Akt é suprimida, as FoxO encontram-se ativas e são translocadas ao núcleo, para dar início à transcrição de parada do ciclo celular, proteção ao estresse oxidativo,

gliconeogênese e autofagia. FoxOs podem ser fosforiladas em resíduos específicos, por vários reguladores em etapas anteriores da via de sinalização, entre eles a AMPK, de modo a promover a localização nuclear e a atividade de transcrição da FoxO (TIKHANOVICH; COX; WEINMAN, 2013; WANG, X.; HU; LIU, 2017).

Na infecção por HCV e em esteatose hepática, FoxO-3a encontra-se alterada, e acredita-se que sua expressão está desregulada em alguns carcinomas hepatocelulares. Um efeito do HCV em relação à FoxO-3a é a regulação da via de sinalização da imunidade inata, além de níveis de atividade aumentados em casos de desnutrição associados à infecção pelo HCV, contribuindo para a resistência à insulina e à persistência da infecção (TIKHANOVICH *et al.*, 2014; TIKHANOVICH; COX; WEINMAN, 2013).

Como mencionado anteriormente, o tratamento com CL em Cl₂₀ causou aumento do índice de fosforilação de FoxO-3a, contudo, em Cl₁₀ esta proteína encontra-se inibida. É necessário, contudo, ressaltar que níveis nucleares aumentados podem significar maior atividade transcricional, com estimulação de autofagia e gliconeogênese. Neste trabalho, contudo, a localização da proteína não foi determinada, o que seria interessante investigar futuramente.

Quanto à caspase-3, estimulada no tratamento com CL em Cl₁₀, comum às vias intrínseca e extrínseca, e considerando que a razão Bax/Bcl-2 encontra-se consideravelmente diminuída, pode-se inferir que, neste caso, a apoptose está sendo iniciada pela via extrínseca, por meio dos receptores celulares, possivelmente por influência do tratamento.

Em pacientes com hepatite C crônica responsivos ao tratamento antiviral, foi observado um aumento na atividade de caspase e da síntese de proteínas pró-apoptóticas, diretamente correlacionado à eliminação do vírus (SEREN *et al.*, 2008).

A apoptose está presente em processos fisiológicos e patológicos, e atua na regulação da homeostase em resposta a diversos estímulos, reduzindo a quantidade de células, e acarretando o remodelamento do tecido através da proliferação celular. O grau de remodelamento varia de acordo com a relação apoptose e proliferação. A Bcl-2 é uma proteína anti-apoptose que inibe a morte celular sem afetar a proliferação. Assim, a expressão de Bcl-2 está associada a um prognóstico favorável em diversos tumores malignos. A proteína Bax, pró-apoptótica, é parte da família Bcl-2, e é a razão Bax/Bcl-2 que determina a suscetibilidade das células à apoptose. A principal enzima efetora deste processo é a caspase-3, e sua ativação pode

ocorrer por 3 vias: as intrínsecas, sendo elas a mitocondrial, relacionada à Bax e Bcl-2; ou a do retículo endoplasmático, ou pela via extrínseca, através de receptores de morte (FAS, FAS-L) (DOLKA; KRÓL; SAPIERZYŃSKI, 2016; SALAKOU *et al.*, 2007). A expressão das proteínas virais de capsídeo e E1/E2, assim como a replicação contínua do RNA genômico do HCV, iniciam a apoptose. A proteína de capsídeo induz a ativação das caspases-8 e -9 (iniciadoras), com subsequente ativação da caspase-3 (efetora), que desencadeia a fragmentação do DNA e a morte celular (MASALOVA *et al.*, 2017).

Por sua vez, o tratamento com PP em células com HCV apresentou a fosforilação de FoxO-3a estimulada, bem como da relação Bax/Bcl-2 em ambas as concentrações do CNB, enquanto as outras proteínas Akt1, AMPK- α , Caspase-3 e SREBP apresentaram-se inibidas ou indetectáveis pós-tratamento, em relação às células não-infectadas.

Em estudo com células de adenocarcinoma de ovário humano (SK-OV-3), o emprego de paclitaxel combinado à piperina resultou em aumento Bax e Caspase-3, com diminuição de Bcl-2. Foi sugerido que este efeito, de indução de apoptose pela via intrínseca, está relacionado à atividade antiproliferativa, indução de parada do ciclo celular, e morte celular programada, em várias linhagens celulares tumorais (PAL *et al.*, 2016).

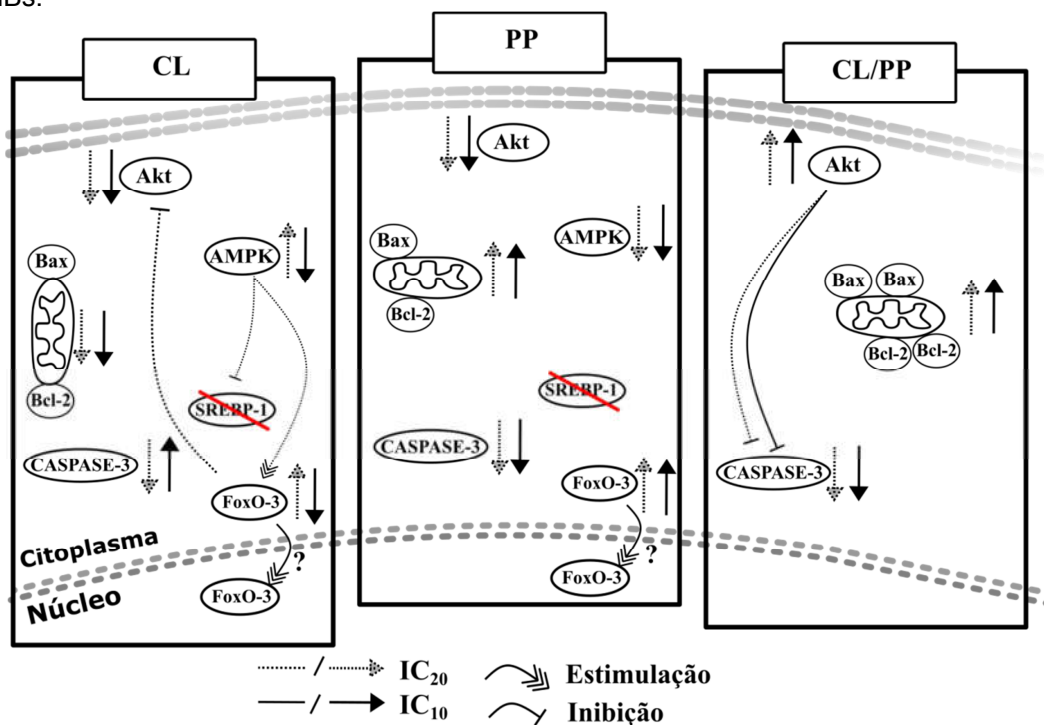
Em contrapartida, no tratamento com CL/PP várias proteínas não foram detectadas por esta técnica. De qualquer forma, a fosforilação de Akt1 e a relação Bax/Bcl-2 mostraram-se intensificadas nas células com o vírus, enquanto a Caspase-3 clivada foi inibida.

Quanto à sua função, a proteína Akt possui mais de 100 substratos, com diversos efeitos regulatórios posteriores, que pertencem às classes funcionais diferentes, como fatores de transcrição, quinases lipídicas e proteicas, enzimas metabólicas, reguladores de ciclo celular, entre outros (MANNING; TOKER, 2017). A interação entre proteínas virais e celulares, com consequente ativação da via PI3K/Akt, facilitam a entrada e a replicação viral, na infecção pelo HCV (LIU, ZHE *et al.*, 2012; SHI; HOFFMAN; LIU, 2016). Além disso, Akt é um proto-oncogene ativado em diversos tipos de câncer, que atua como fator anti-apoptótico em diversos estímulos, como radiação, hipóxia e quimioterapia (ZHAO *et al.*, 2017). Portanto, é difícil determinar se o tratamento com CL/PP poderia apresentar efeitos benéficos ou

prejudiciais no tratamento do HCV, considerando as duas vias ativadas, que atuam de forma divergente na regulação da apoptose.

A Figura 18 apresenta um esquema dos resultados observados nas vias de metabolismo e sinalização celular após tratamento com CL, PP e CL/PP, neste trabalho.

Figura 18. Esquema das vias de sinalização e metabolismo celular após tratamento com os CNBs.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os tratamentos com os CNBs CL, PP e CL/PP atuam em diferentes vias de sinalização celular, com respostas que podem variar de acordo com a concentração empregada. A estimulação/inibição de uma proteína específica pode desencadear alterações em outras vias; contudo, em alguns casos, não é possível determinar a relação direta das atividades dos tratamentos em vias diferentes.

Grupo 2. Naringenina

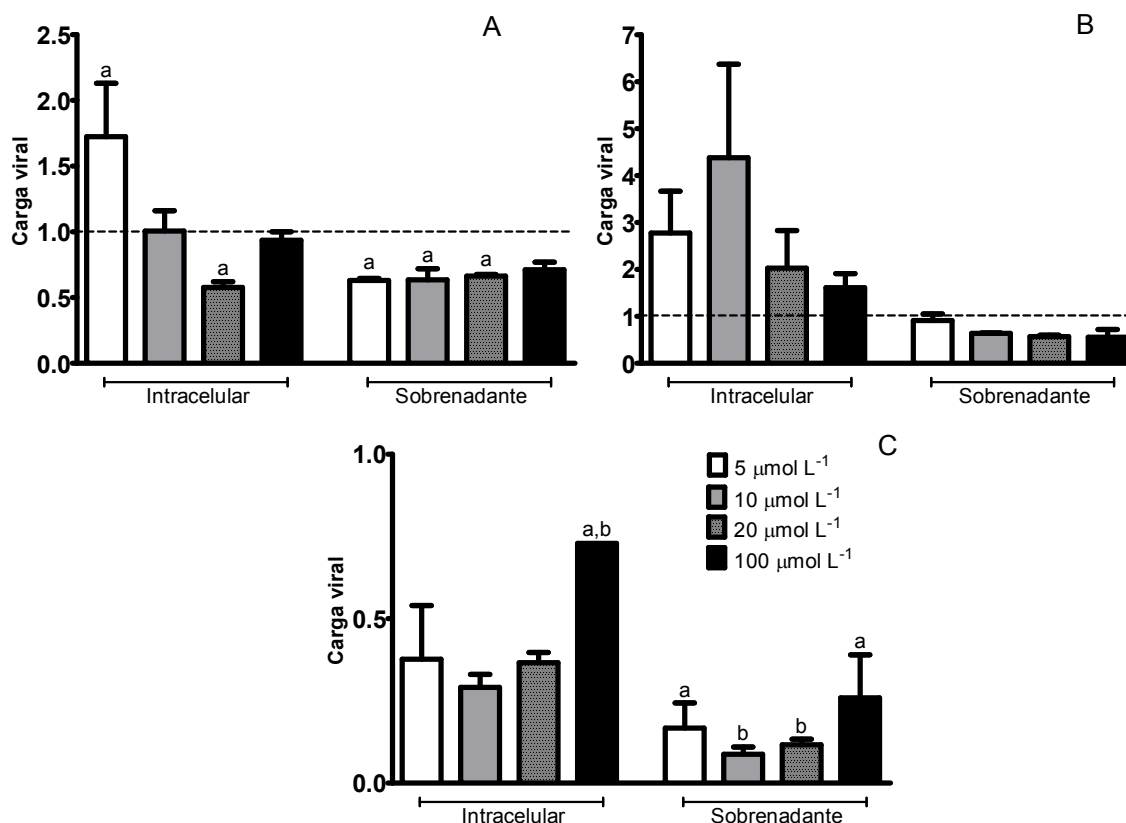
5.10. Quantificação de RNA viral

A Figura 19A apresenta os resultados obtidos para 1 dia de incubação. Neste período, foi observada diferença significativa do composto a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ no meio intracelular, que demonstrou estimulação da replicação viral. Contudo, é possível observar que a concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ teve um efeito inibitório acentuado na síntese de carga viral no meio intracelular, com redução para em média ($\pm$ desvio padrão) $0,57 \pm 0,06$ de índice de carga em relação ao CV. No mesmo período, a atividade no sobrenadante foi similar em todas as concentrações de NG, com média geral de $0,66 \pm 0,06$ de índice de carga viral.

Após o período de 3 dias de incubação, indicado na Figura 19B, a variação observada não teve diferença estatisticamente significativa, contudo foi constatado que o tratamento com NG resultou em estímulo replicativo no meio intracelular, ao passo que no sobrenadante as concentrações apresentaram redução de carga viral, com média geral de $0,67 \pm 0,19$. Assim, é possível inferir que, neste caso, ainda que o vírus continue replicando intensamente no meio intracelular, a NG exerceu efeito de inibição entre as etapas de montagem e liberação, reduzindo a detecção do vírus no meio extracelular.

A incubação por 7 dias, por sua vez, indicada na Figura 19C, produziu os resultados mais expressivos. A análise estatística indicou diferença significativa entre a concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ do meio intracelular, com carga viral média de $0,73 \pm 0,001$, e as concentrações do meio extracelular. Nas concentrações de 5, 10 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ do meio intracelular, o tratamento com NG resultou em carga viral média de $0,34 \pm 0,11$, e no sobrenadante os tratamentos aplicados exibiram, em média geral, $0,16 \pm 0,11$ de índice de carga viral.

Figura 19. Índice de carga viral de RNA do HCV em meio intracelular e sobrenadante de células SGR-JFH1 após tratamento com NG.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para quantificação de RNA do HCV, com resultado em índice de carga viral, calculado a partir da relação tratamento por amostra controle de veículo (CV), realizado em células SGR-JFH1. **A, B, C:** períodos de incubação de 1, 3 e 7 dias, respectivamente. a: $p \leq 0,05$ e b: $p \leq 0,01$.

Até o momento, poucos estudos foram encontrados investigando o efeito antiviral da NG. Lyu, Rhim e Park (2005) avaliaram os efeitos de diversos flavonoides quanto ao vírus herpes humano (HSV 1 e 2), incluindo a NG, e relataram baixa citotoxicidade em células Vero e forte efeito inibitório viral.

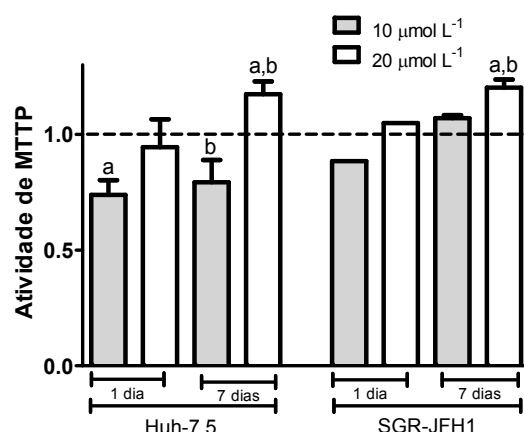
A atividade de NG em relação ao HCV foi previamente avaliada, e relacionada à inibição de secreção de RNA e proteína de capsídeo, assim como da atividade enzimática de MTTP (GOLDWASSER *et al.*, 2011; NAHMIAS *et al.*, 2008).

Portanto, os resultados deste trabalho revelam potencial inibitório da NG sobre a liberação da partícula viral, corroborando com o descrito na literatura, mas também atuando sobre a síntese viral de forma significativa.

5.11. Atividade de MTTP

Na Figura 20 é possível observar que foi registrada diferença estatisticamente significativa na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 7 dias de incubação em ambas as linhagens, em que houve aumento da atividade enzimática, em relação à concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em células Huh-7.5, para ambos os períodos estudados. Assim, apenas em menor concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) a NG foi capaz de causar inibição em MTTP, com média ($\pm$ desvio padrão) de $0,81 \pm 0,10$ de índice de atividade total, entre as células Huh-7.5 durante o período total, e as SGR-JFH1, em 1 dia de incubação. Em 7 dias, o vírus parece retomar a atividade normal da enzima, e a NG não causou alterações, em relação ao CV.

Figura 20. Índice da atividade de MTTP em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 tratadas NG.



Fonte: Elaborado pela autora.

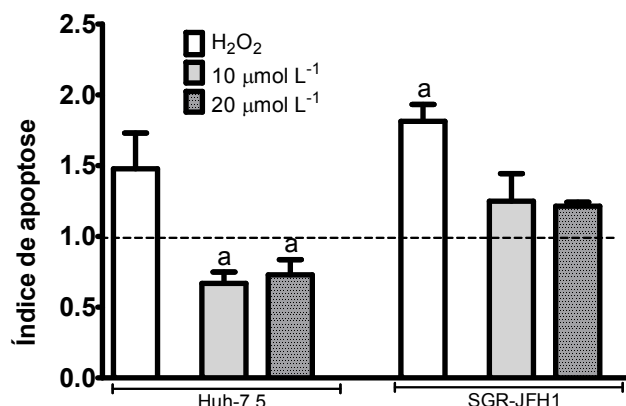
Legenda: Atividade de MTTP em lisado celular das linhagens Huh-7.5 e SGR-JFH1 com resultado em índice de atividade de MTTP, calculado a partir intensidade de fluorescência de cada tratamento (FIU) em relação ao CV (DMSO 0,1%). *a* e *b*: $p \leq 0,05$.

Em condições distintas, Nahmias e colaboradores (2008) observaram efeito inibitório significativo da NG em relação à atividade de MTTP. Contudo, no presente estudo, com resultados menos expressivos em células SGR-JFH1, é possível inferir que a atividade antiviral observada não pode ser diretamente atribuída à inibição da atividade enzimática, pela ação deste CNB.

5.12. Análise de apoptose

Na Figura 21 está representado o resultado da análise do processo de apoptose inicial, no qual não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com NG. Contudo, é possível perceber que nas células não-infectadas, a NG causa inibição da apoptose com índice de aproximadamente $0,70 \pm 0,11$ (média $\pm$ desvio padrão) em relação ao CV, enquanto que nas células com a presença do HCV o efeito é inverso, com índice de estimulação de, em média, $1,23 (\pm 0,16)$.

Figura 21. Índice de apoptose por citometria de fluxo em células tratadas com NG.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Índice de apoptose calculado pela relação tratamento por controle de veículo (DMSO 0,1%). Controle de indução de apoptose (H₂O₂ 1 mmol L⁻¹) e tratamentos com NG realizados em células Huh-7.5 e SGR-JFH1. a: $p \leq 0,05$.

Vários estudos descreveram os efeitos de indução de morte celular por apoptose mediados pela NG, em diversas linhagens celulares, como células U937 de leucemia humana (JIN *et al.*, 2009), HCT116 e SW480 de câncer de cólon (SONG *et al.*, 2016), HL-60 de leucemia promielocítica aguda (KANNO *et al.*, 2006).

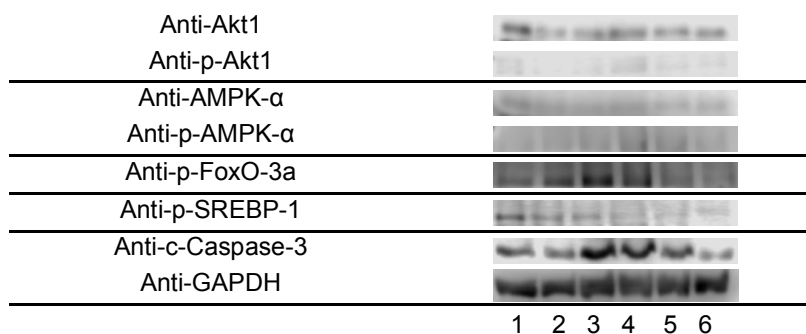
A propensão ao aumento da apoptose precoce em células com HCV observada nas células SGR-JFH1 após tratamento com NG, como discutido anteriormente, revela um resultado promissor que pode ser explorado pormenorizadamente para fins terapêuticos.

5.13. Determinação de níveis de expressão de proteínas por *western blotting*

As concentrações testadas para os tratamentos com NG em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 seguiram os valores de concentração inibitória de 10% ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 20% ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), equivalentes para ambas as linhagens.

Na Figura 22 foram demonstradas as imagens capturadas por *scanner* das membranas de *western blotting*, após a revelação de reação quimioluminescente, para as proteínas de interesse.

Figura 22. Painel de proteínas avaliadas por *western blotting* após tratamento de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 com NG.

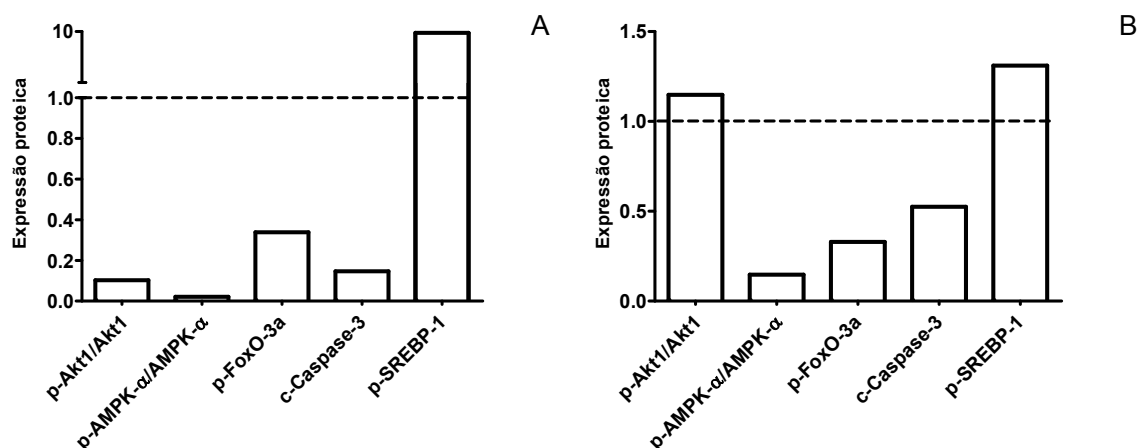


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Células Huh-7.5 / células SGR-JFH1: (1) / (4) Controle de veículo; (2) / (5) NG a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; (3) / (6) NG a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Na Figura 23 estão representados os níveis de expressão relativa das proteínas de interesse, calculadas pela razão SGR-JFH1/Huh-7.5.

Figura 23. Análise de proteínas avaliadas por *western blotting* após tratamento com NG.

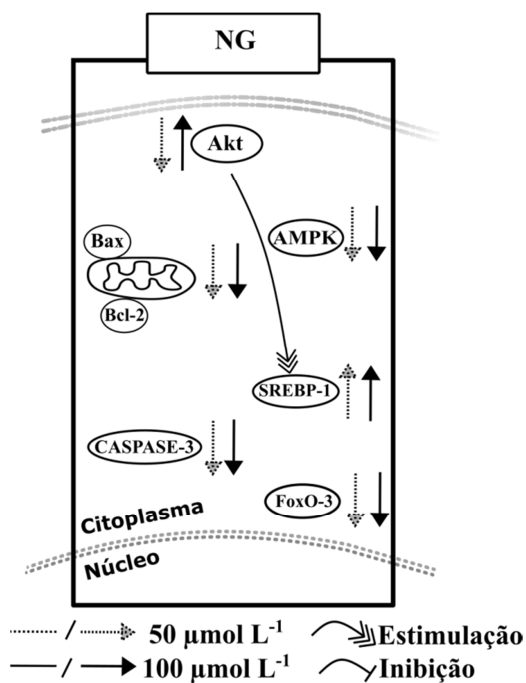


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados calculados pela relação SGR-JFH1/Huh-7.5, e normalizados pelo CV (controle de veículo). (A) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente à Cl_{20} ; e (B) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente à Cl_{10} .

A Figura 24 apresenta um esquema dos resultados observados nas vias de metabolismo e sinalização celular após tratamento com NG.

Figura 24. Esquema das vias de sinalização e metabolismo celular após tratamento com NG.



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o tratamento com NG em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ causou aumento significativo da expressão de p-SREBP-1, com inibição das outras vias estudadas, a fosforilação de Akt1, AMPK- α , FoxO-3a, e Caspase-3 clivada, nas células SGR-JFH1, em comparação às células sem o vírus. No tratamento a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tanto o nível de fosforilação de Akt1 em relação à proteína nativa, quanto a p-SREBP-1 apresentaram-se moderadamente ativadas, enquanto as outras vias estudadas foram inibidas.

Em células infectadas pelo HCV, os níveis de p-Akt/Akt se encontram diminuídos, em consequência da redução da habilidade de proteínas IRS de atrair PI3K, assim minimizando sua ativação. A via PI3K-Akt é responsável por quase toda a atividade metabólica da insulina. Jia e colaboradores (2018) relataram a diminuição da fosforilação de IRS-1 e o aumento dos níveis de p-Akt, indicando que o tratamento com NG poderia induzir a melhora da sensibilidade à insulina através da via de sinalização IRS-1/PI3K/Akt.

Em contrapartida, a infecção pelo HCV ativa a expressão de ciclooxygenase-2, que contribui para a replicação do RNA viral e induz o carcinoma hepatocelular pela ativação da via de sinalização PI3K-Akt, que está diretamente associada ao mecanismo de regulação da inibição de apoptose durante a infecção aguda e a persistência do vírus a longo prazo (REDDY *et al.*, 2014).

Além disso, vários estudos investigaram o potencial antitumoral da NG, relatando que o tratamento com este CNB diminui a proliferação de células tumorais e induz a apoptose, através da inibição de vias de sinalização de inflamação e sobrevivência como NF- κ B, MAPK e Akt, em câncer de mama, próstata, glioma, cólon e melanoma (ZENG *et al.*, 2018).

Desta forma, a estimulação da fosforilação de Akt1 observada no tratamento com NG na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, se analisada isoladamente, poderia assumir um viés positivo, na melhora da sensibilidade à insulina, ou negativo, por indução ao desenvolvimento tumoral.

A replicação do RNA viral do HCV necessita da via de biossíntese de ácidos graxos. Em estudo em cultura celular (Huh-7, transfectadas com HCV), foi demonstrado que a atividade de transcrição de SREBPs encontra-se aumentada pela proteína NS4B, bem como a atividade de FAS, pela via de sinalização de Akt, indicando que a lipogênese mediada por NS4B pode contribuir para a replicação efetiva do HCV. A esteatose hepática é um fator importante para a progressão da

fibrose e do carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C crônica. Desta forma, o acúmulo de lipídios mediado por NS4B pode contribuir para a evolução da doença (PARK *et al.*, 2009).

Assim, analisando o efeito da NG na cultura celular infectada com HCV, quanto ao aumento do nível de expressão de SREBP observado neste trabalho em relação aos níveis apresentados pela célula não-infectada, e concomitante ou não ao aumento dos níveis de p-Akt1/Akt1, fica aparente que este CNB não apresenta desempenho satisfatório quanto à proteção hepática mediante a infecção viral, ao menos nas condições estudadas.

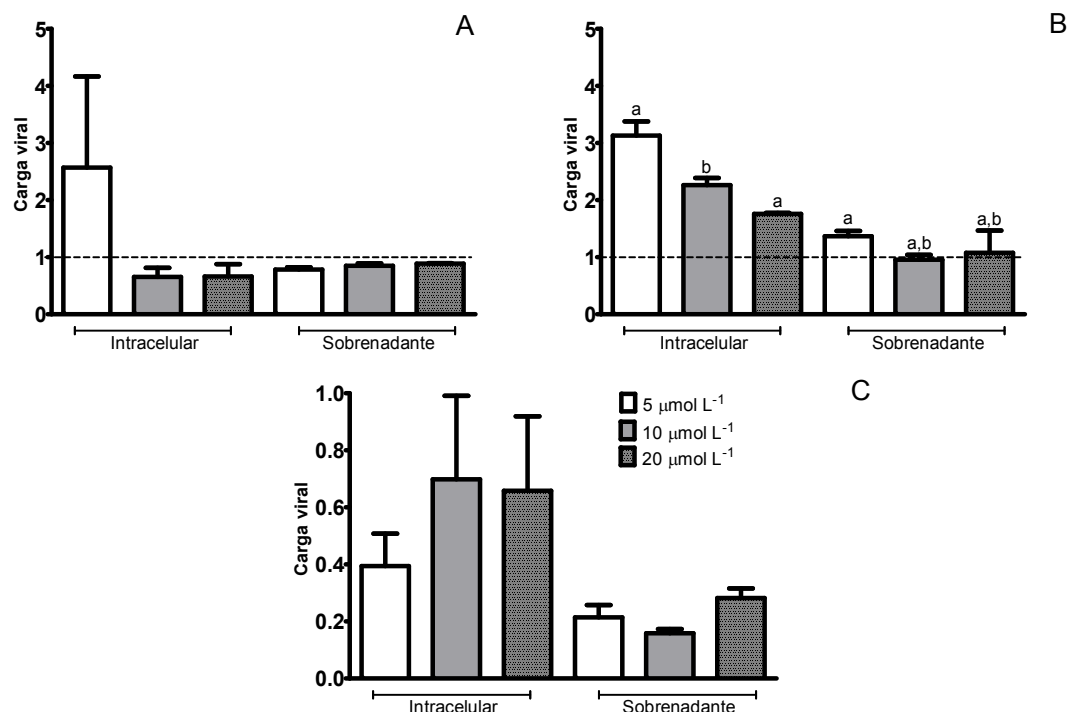
Grupo 3. Nobiletina

5.14. Quantificação de RNA viral

Na Figura 25A, para 1 dia de incubação, a análise estatística indica que não houve diferença significativa; contudo, é possível perceber que a NOB em $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ não demonstrou efeito inibitório no meio intracelular, mas as outras concentrações causaram a redução no índice de carga viral relativo ao CV de, em média, $0,66 \pm 0,22$ (média $\pm$ desvio padrão). No meio extracelular a média geral foi de $0,84 \pm 0,06$.

Para 3 dias de incubação, os resultados representados na Figura 25B mostram que todas as concentrações não exerceram efeito inibitório. Enquanto algumas concentrações do tratamento não exibiram efeito, e se mantiveram em nível equivalente ao CV, outras causaram o aumento da carga viral.

Por fim, após 7 dias de incubação (Figura 25C) pode-se considerar que as concentrações de 10 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ não surtiram efeito no meio intracelular, enquanto as outras concentrações provocaram inibição significativa, com destaque à diminuição da liberação do vírus no meio extracelular, com índice de carga viral de $0,22 \pm 0,07$.

Figura 25. Índice de carga viral do HCV em células SGR-JFH1 após tratamento com NOB.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Ensaio de PCR em tempo real para quantificação de RNA do HCV, com resultado em índice de carga viral calculado a partir da relação tratamento por CV, realizado em células SGR-JFH1.

A, B, C: períodos de incubação de 1, 3 e 7 dias, respectivamente. *a* e *b*: $p \leq 0,05$.

Os trabalhos encontrados na literatura investigando a atividade antiviral da NOB são esparsos. Lin e colaboradores (2017) descreveram atividade antiviral da NOB em células Vero E6 infectadas por chikungunya. Em células de leucemia linfoblástica aguda com soro humano HCV positivo adicionado, foi relatado que a NOB inibiu a infecção por HCV de forma dose-dependente (SUZUKI *et al.*, 2005).

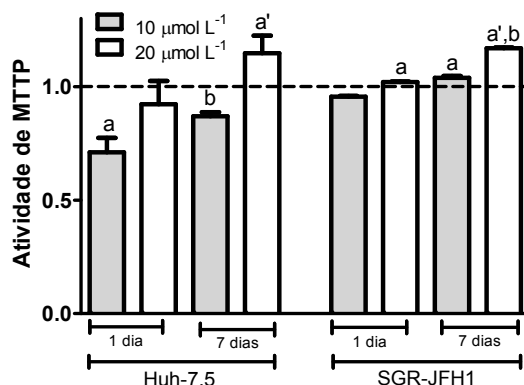
Em síntese, a NOB administrada isoladamente teve o desempenho limitado em relação à carga viral do HCV, e dependente do tempo de exposição das células ao composto.

5.15. Atividade de MTTP

Na Figura 26 estão representados os resultados obtidos de ação da enzima MTTP. Apenas nas células Huh-7.5 foi observada a inibição da atividade enzimática,

na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, após 1 e 7 dias de incubação ($0,71 \pm 0,09$ e $0,87 \pm 0,02$, respectivamente), neste último período com efeito foi menos pronunciado. Nas SGR-JFH1, apenas na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 7 dias foi observada a estimulação da MTTP após tratamento com o CNB.

Figura 26. Análise da atividade de MTTP em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 tratadas com NOB.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Análise da atividade de MTTP em lisado celular das linhagens Huh-7.5 e SGR-JFH1 com resultado em índice de atividade de MTTP, calculado a partir intensidade de fluorescência de cada tratamento (FIU) em relação ao CV (DMSO 0,1%). a, b: $p \leq 0,05$; a': $p \leq 0,01$.

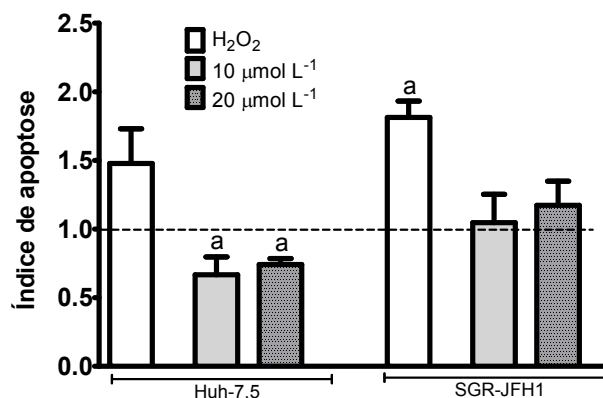
Em estudo usando a linhagem de hepatócitos HepG2, Mulvihill e colaboradores (2011) não observaram alterações na quantificação de mRNA ou na expressão hepática da enzima MTTP, após tratamento das células com NOB.

Os resultados indicam que o efeito observado nos hepatócitos foi discreto, e que em células infectadas com o HCV a atividade enzimática não foi fator determinante para a inibição da liberação da partícula viral no sobrenadante.

5.16. Análise de apoptose

Na Figura 27 estão representados os resultados obtidos neste ensaio, com inibição de apoptose inicial em ambas as concentrações do tratamento em células Huh-7.5 em níveis similares, conquanto nas células infectadas com o HCV foi observada discreta estimulação de apoptose em tratamento com NOB a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 27. Análise de níveis de apoptose em células tratadas com NOB.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Índice de apoptose calculado pelo resultado observado nos tratamentos, em relação ao CV. Controle de indução de apoptose (H_2O_2 1 mmol L^{-1}) e tratamentos com NOB realizados em células Huh-7.5 e SGR-JFH1. a: $p \leq 0,05$.

Em células β pancreáticas INS-1D, Takii e colaboradores (2017) relataram a atividade da NOB na supressão de apoptose precoce induzida por taspigargina.

Um estudo combinando o uso de NOB e paclitaxel em células de câncer de ovário descreveu o aumento significativo de apoptose de forma dose-dependente; contudo, o tratamento com NOB ou a droga isoladamente não mostrou indução de apoptose (MA *et al.*, 2015). Outra linhagem de células de câncer de ovário com resistência a múltiplas drogas apresentou indução de apoptose significativa mediante tratamento com NOB (JIANG; GUO; WANG, 2018).

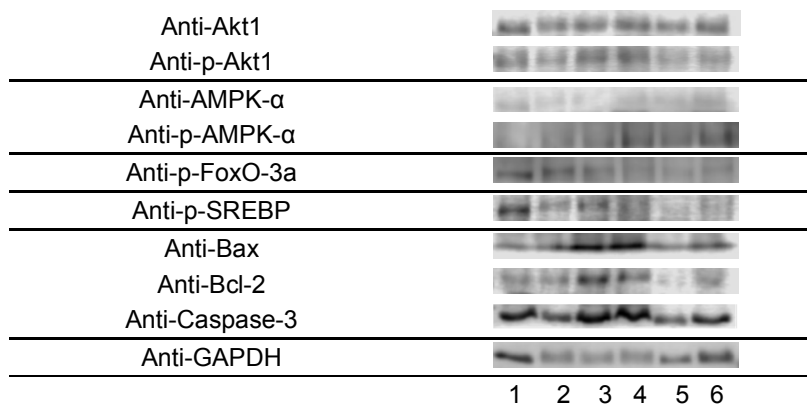
Os resultados obtidos indicaram indução limitada de apoptose no tratamento com NOB, restrita a células SGR-JFH1.

5.17. Determinação de níveis de expressão de proteínas por *western blotting*

As concentrações testadas para os tratamentos com NOB em células Huh-7.5 e SGR-JFH1 seguiram os valores de concentração inibitória de 10% ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 20% ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$), equivalentes para ambas as linhagens.

Na Figura 28 foram exemplificadas as membranas de *western blotting* após o tratamento com NOB em células Huh-7.5 e SGR-JFH1. As proteínas FoxO-3a e SREBP não apresentaram níveis detectáveis neste experimento.

Figura 28. Painele de proteínas avaliadas por *western blotting* após tratamento de células Huh-7.5 e SGR-JFH1 com NOB.

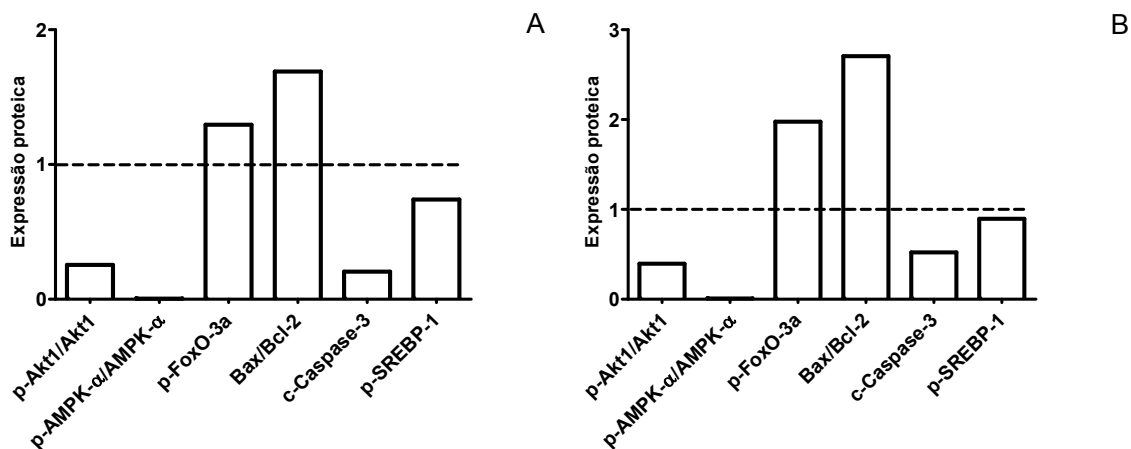


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Células Huh-7.5 / células SGR-JFH1: (1) / (4) Controle de veículo; (2) / (5) NOB a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (3) / (6) NOB a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Na Figura 29 estão representados os resultados obtidos.

Figura 29. Análise de proteínas avaliadas por *western blotting* após tratamento com NOB.



Fonte: Elaborado pela autora.

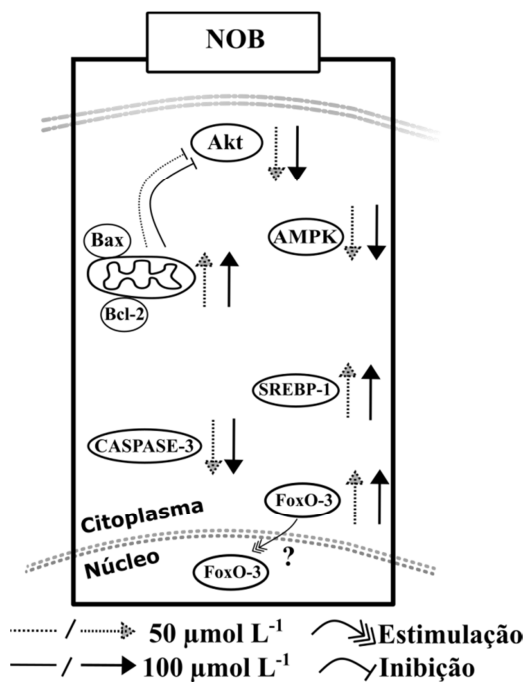
Legenda: Relação SGR-JFH1/Huh-7.5, com resultados normalizados pelo CV (controle de veículo). (A) 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente à Cl_{20} ; e (B) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente à Cl_{10} .

A Figura 30 apresenta um esquema dos resultados observados nas vias de metabolismo e sinalização celular após tratamento com NOB.

O tratamento com NOB em células SGR-JFH1 em relação às células Huh-7.5 apresentou níveis de fosforilação da proteína FoxO-3a aumentados, bem como a relação Bax/Bcl2, em ambas as concentrações. As outras proteínas encontraram-se inibidas em diferentes níveis, exceto a SREBP-1 fosforilada que apresentou níveis quase equivalentes de expressão que nas células sem o vírus, no tratamento em 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os efeitos de concentração, por sua vez, foram muito similares.

A inibição da via de Akt implica em diminuição de proliferação, aumento de apoptose e da parada do ciclo celular (JIANG; GUO; WANG, 2018). Foi observada a inibição da fosforilação de Akt em células de hepatocarcinoma humano HepG2 pelo tratamento com paclitaxel combinado com NOB, ou apenas a NOB a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (MA *et al.*, 2015). Ainda em células HepG2, o tratamento com NOB provocou aumento significativo da razão Bax/Bcl-2, indicando a atividade antitumoral, com consequente efeito antiproliferativo (CHU *et al.*, 2017).

Figura 30. Esquema das vias de sinalização e metabolismo célula após tratamento com NOB.



Fonte: Elaborado pela autora.

FoxO-3a, por sua vez, atua na regulação de autofagia, apoptose e estresse oxidativo em resposta a várias condições de estresse ou patológicas. Nestes casos,

FoxO-3a é fosforilada por Akt e retido no citoplasma, inibindo a atividade de transcrição. Em tecido hepático após lesão de isquemia-reperfusão de camundongos, a NOB inibiu a fosforilação de Akt e aumentou significativamente os níveis proteicos de FoxO-3a, com translocação para o núcleo, o que resulta em indução de autofagia mediada por FoxO-3a. Desta forma, a NOB atenuou os danos hepáticos através da indução de autofagia, pela via PI3K/Akt/FoxO-3a (DUSABIMANA *et al.*, 2019).

Quanto à proteína FoxO-3a, seria interessante determinar sua localização em estudos futuros, se nuclear ou no citoplasma, haja vista que a atividade de transcrição é dependente da localização em que ela se encontra, e que em diferentes tratamentos foi observado o efeito de estimulação em células infectadas pelo HCV.

Análise de desempenho

Para avaliar o desempenho dos CNBs, um sistema de pontuação foi realizado, a partir da inibição de carga viral, da inibição da atividade de MTTP e da indução da apoptose, em relação aos resultados médios obtidos. Assim, considerando o índice de carga viral para a PP a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, que foi de $0,58 \pm 0,005$, a inibição, neste caso, seria de 0,4 em relação ao CV. Foi realizada a soma das médias dos resultados de inibição das concentrações analisadas em cada tratamento, para cada período de incubação, pois na quantificação de RNA viral apenas os CNBs PP e NG tiveram a concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ testada. Foi levado em consideração, além disso, a quantidade de períodos de incubação do ensaio e os fatores de repetição, como duas linhagens celulares, ou meio intra e extracelular, como forma de ponderação dos resultados. Desta forma, no ensaio de carga viral, com 3 períodos de incubação e 2 meios, o fator de multiplicação foi igual a 6, enquanto que no ensaio de indução de apoptose, com apenas 1 período de incubação, mas duas linhagens celulares, o fator foi igual a 2. Os resultados de pontuação estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Pontuação de desempenho geral dos CNBs.

Carga viral																											
Meio intracelular														Meio extracelular													
Tempo de incubação (dias)														Tempo de incubação (dias)													
1				3				7				1				3				7							
Concentração (μmol L ⁻¹)																											
	5	10	20	100	5	10	20	100	5	10	20	100	5	10	20	100	5	10	20	100	5	10	20	100	Total (x6)		
CL	0	0	0	NA	0	0	0	NA	0,6	0,6	0,7	NA	0,1	0,2	0,3	NA	0	0	0	NA	0,5	0,7	0,7	NA	8,8		
PP	0	0	0	0,4	0,4	0	0	0	0,7	0,9	0,8	0,1	0,3	0,2	0,2	0	0	0,3	0,2	0,2	0,7	0,9	0,9	0,6	11,7		
CL/PP	0,4	0,4	0,6	NA	0,8	0	0	NA	0	0,5	0,5	NA	0,3	0,3	0,4	NA	0,2	0,1	0,4	NA	0,7	0,8	0,7	NA	14,2		
NG	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0,4	0,7	0,6	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0	0,4	0,4	0,2	0,7	0,9	0,9	0,6	11,3		
NOB	0	0,1	0	NA	0	0	0	NA	0,4	0	0	NA	0,2	0,1	0,1	NA	0	0	0	NA	0,7	0,8	0,7	NA	6,2		

Atividade de MTTP										Indução de apoptose										
Huh-7.5					SGR-JFH1					Huh-7.5					SGR-JFH1					
Tempo de incubação (dias)					Tempo de incubação (dias)															
1		7			1		7													
Concentração (μmol L ⁻¹)										Concentração (μmol L ⁻¹)										
	10	20	10	20	10	20	10	20	Total (x4)		10	20	10	20	Total (x2)		10	20	Total (x2)	Resultado final
CL	0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	1,6	CL	0,0	0,0	0,8	0,9	1,7	CL				12,1
PP	0,3	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	1,5	PP	0,0	0,0	0,6	0,3	0,9	PP				14,1
CL/PP	0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	1,2	CL/PP	0,0	0,0	0,3	0,0	0,3	CL/PP				15,6
NG	0,3	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	1,3	NG	0,0	0,0	0,3	0,2	0,5	NG				13,0
NOB	0,3	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	1,1	NOB	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	NOB				7,5

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: NA: não se aplica (concentração não testada)

Portanto, quanto a estes parâmetros isoladamente, é possível observar que o desempenho dos CNBs, em ordem decrescente de pontuação, pode ser classificado como CL/PP (15,6) > PP (14,1) > NG (13,0) > CL (12,1) > NOB (7,5).

Na determinação do níveis de expressão de proteínas, a análise foi realizada de forma qualitativa. A classificação foi realizada da seguinte maneira: quanto à inibição, em níveis de índice 0 até 0,25 considerou-se ↓↓↓; de 0,26 até 0,50 ↓↓; e, de 0,51 até 0,99 ↓. Quanto à estimulação, de índice 1,1 até 1,5, considerou-se ↑; de 1,6 até 2,0 ↑↑; e, por fim, acima de 2,1, considerou-se ↑↑↑. Os resultados foram demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise qualitativa dos CNBs quanto à determinação dos níveis de expressão protéicas.

	Akt1		AMPK-α		FoxO-3a		Bax/Bcl-2		c-Caspase-3		SREBP	
	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20
CL	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↑	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓	↑	↓↓	-	-
PP	↓	↓	↓	↓	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↓	↓↓	-	-
CL/PP	↑↑	↑↑	-	-	-	-	↑↑	↑↑	↓↓	↓↓	-	-
NG	↑	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	-	-	↓	↓↓↓	↑	↑↑↑
NOB	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑	↓	↓↓↓	↓	↓

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: - : proteína não detectada. A classificação foi realizada da seguinte maneira: quanto à inibição, em níveis de índice 0 até 0,25 considerou-se ↓↓↓; de 0,26 até 0,50 ↓↓; e, de 0,51 até 0,99 ↓. Quanto à estimulação, de índice 1,1 até 1,5, considerou-se ↑; de 1,6 até 2,0 ↑↑; e, por fim, acima de 2,1, considerou-se ↑↑↑.

VI. Conclusões



VI. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

Referências

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

ASSINI, J. M. *et al.* Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr^{-/-}* mice. *J. Lipid Res.*, v. 54, n. 3, p. 711–724, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269394> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3617945>. Acesso em: 5 fev. 2019.

ASSIS, R. P. *et al.* Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, n. 332, 2017.

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

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

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

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

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

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

BUTT, A. M. *et al.* Parallel expression profiling of hepatic and serum microRNA-122 associated with clinical features and treatment responses in chronic hepatitis C patients. *Sci. Rep.*, v. 6, n. October 2015, p. 21510, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/srep/2016/160222/srep21510/full/srep21510.html>. Acesso em: 28 out. 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JARDIM, A. C. G. *et al.* Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antiviral Res.*, v. 115, p. 39–47, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.018>. Acesso em: 28 out. 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

KONDURU, A. S.; LEE, B.-C.; LI, J.-D. Curcumin suppresses NTHi-induced CXCL5 expression via inhibition of positive IKK β pathway and up-regulation of negative MKP-1 pathway. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 31695, p. 1–15, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27538525> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4990917>. Acesso em: 5 fev. 2019.

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

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

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

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

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

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

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

LIU, F. *et al.* Efficient suppression of hepatitis C virus replication by combination treatment with miR-122 antagonism and direct-acting antivirals in cell culture systems. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 30939, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep30939>. Acesso em: 28 out. 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. DE L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&%5Cnpid=S0104-42302011000100024. Acesso em: 6 jan. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEREN, S. *et al.* Potential role of lycopene in the treatment of hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma. *Nutr. Cancer*, v. 60, n. 6, p. 729–735, 2008. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580802419772>. Acesso em: 28 out. 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Apêndice



APÊNDICE

Apêndice I: Concentrações testadas no ensaio de citotoxicidade empregando o método de coloração por MTT.

CNB	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Curcumina (CL)	400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56.
Piperina (PP)	400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56.
Naringenina (NG)	2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95.
Nobiletina (NOB)	400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56.
Curcumina e piperina (CL/PP)	(CL/PP 3:1) 100 + 50; 50 + 25; 20 + 10; 10 + 5; 5 + 2,5.
	(CL/PP 20:1) 95 + 5; 47,5 + 2,5; 19 + 1; 9,5 + 0,5; 0,95 + 0,05.
	(CL/PP 6:1) 100 + 20; 50 + 10; 20 + 4; 10 + 2; 1 + 0,2.
	(CL/PP 1:3) 25 + 50; 12,5 + 25; 5 + 10; 2,5 + 5; 0,25 + 0,5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Apêndice II: Pós-teste de Games-Howell para o ensaio de proliferação celular.

Célula/Incubação			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
Huh-7.5	3 h	{1}										
Huh-7.5	1 dia	{2}										
Huh-7.5	3 dias	{3}	<0,01	<0,01								
Huh-7.5	5 dias	{4}	<0,01	<0,01	0,04							
Huh-7.5	7 dias	{5}	0,01	0,01	0,01	0,01						
Huh-7.5	10 dias	{6}	0,01	0,01	0,01	0,01						
SGR-JFH1	3 h	{7}			<0,01	<0,01	0,01	0,01				
SGR-JFH1	1 dia	{8}				<0,01	0,01	0,01				
SGR-JFH1	3 dias	{9}	0,04				0,01	0,01	0,05			
SGR-JFH1	5 dias	{10}						0,02				
SGR-JFH1	7 dias	{11}	0,01	0,01	0,01	0,01			0,01	0,01	0,01	0,05
SGR-JFH1	10 dias	{12}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,03		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Fonte: Elaborado pela autora.

Apêndice III: Resultados estatisticamente significativos do pós-teste de Tukey para a quantificação de carga viral.

		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
3 h	{1}						
1 dia	{2}						
3 dias	{3}						
5 dias	{4}		0,02				
7 dias	{5}	0,02	0,01				
10 dias	{6}	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

Fonte: Elaborado pela autora.

Apêndice IV: Teste de Tukey HSD para a quantificação de carga viral em células SGR-JFH1 tratadas com CL, PP e CL/PP, em 1 dia de incubação.

Localização/Tratamento/ Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		{1}
Intracelular PP 5	{1}	
Intracelular PP 100		0,03
Intracelular CLPP 5		0,02
Intracelular CLPP 10		0,03
Intracelular CLPP 20		0,01
Sobrenadante CL 20		0,03
Sobrenadante PP 5		0,05
Sobrenadante PP 10		0,04
Sobrenadante PP 20		0,04
Sobrenadante CLPP 10		0,05
Sobrenadante CLPP 20		0,02

Fonte: Elaborado pela autora.

Apêndice V: Pós-teste de Tukey para a quantificação de carga viral em células SGR-JFH1 tratadas com CL, PP e CL/PP, em 3 dias de incubação.

Localização/Tratamento/ Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
Intracelular CL 5	{1}							
Intracelular CL 10	{2}							
Intracelular CL 20	{3}							
Intracelular PP 5	{4}							
Intracelular PP 10	{5}							
Intracelular PP 20	{6}							
Intracelular PP 100	{7}	0,05	0,01	0,01	< 0,001	0,01	0,03	
Intracelular CLPP 5								< 0,001
Intracelular CLPP 10								< 0,001
Intracelular CLPP 20								< 0,001
Sobrenadante CL 5								< 0,001
Sobrenadante CL 10								< 0,001
Sobrenadante CL 20								< 0,001
Sobrenadante PP 5								< 0,001
Sobrenadante PP 10								< 0,001
Sobrenadante PP 20								< 0,001
Sobrenadante PP 100								< 0,001
Sobrenadante CLPP 5								< 0,001
Sobrenadante CLPP 10								< 0,001
Sobrenadante CLPP 20								< 0,001

Fonte: Elaborado pela autora.

Apêndice VI: Resultados com significância estatística pelo teste de Tukey HSD para o ensaio de atividade de MTTP, em tempo de incubação de 7 dias.

Linhagem/Tratamento/ Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
Huh-7.5 CL 10 {1}					
Huh-7.5 CL 20 {2}	< 0,01				
Huh-7.5 PP 10 {3}		< 0,01			
Huh-7.5 PP 20 {4}	< 0,01		< 0,01		
Huh-7.5 CL/PP 10 {5}		< 0,01		< 0,01	
Huh-7.5 CL/PP 20 {6}	< 0,01		< 0,01		< 0,01
SGR-JFH1 CL 10 {7}					
SGR-JFH1 CL 20 {8}	< 0,01		< 0,01		< 0,01
SGR-JFH1 PP 10 {9}			0,04		0,05
SGR-JFH1 PP 20 {10}	0,01		< 0,01		0,01
SGR-JFH1 CL/PP 10 {11}			0,04		0,05
SGR-JFH1 CL/PP 20 {12}	< 0,01		< 0,01		< 0,01

Fonte: Elaborado pela autora.

Apêndice VII: Concentrações analisadas das CNBs no ensaio de *western blotting*.

	Huh-7.5		SGR-JFH1	
	CI_{10} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CI_{20} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CI_{10} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CI_{20} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
CL	20,0	15,0	25,0	20,0
PP	100,0	50,0	100,0	50,0
CL/PP	20,0	15,0	15,0	10,0

Fonte: Elaborado pela autora.