



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Mariana Nogueira Batista

Avaliação *in vitro* do efeito da cafeína na inibição do vírus da
hepatite C

São José do Rio Preto
2014

Mariana Nogueira Batista

Avaliação *in vitro* do efeito da cafeína na inibição do vírus da
Hepatite C

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal

Co-orientador: Dr. Bruno Moreira Carneiro

São José do Rio Preto
2014

Batista, Mariana Nogueira.

Avaliação in vitro do efeito da cafeína na inibição do vírus da hepatite C / Mariana Nogueira Batista. -- São José do Rio Preto, 2014

92 f. : il., tabs.

Orientador: Paula Rahal

Coorientador: Bruno Moreira Carneiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Hepacivirus. 3. Hepatite C. 4. Vírus - Aspectos genéticos. 5. Linhagem celular. 6. Agentes antivirais. 7. Cafeína.
I. Rahal, Paula. II. Carneiro, Bruno Moreira. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Mariana Nogueira Batista

Avaliação *in vitro* do efeito da cafeína na inibição do vírus da
Hepatite C

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro
UNESP – São José do Rio Preto
Co-orientador

Prof. Dr^a. Laura Cristina Sichero Vetorazzo
ICESP – São Paulo

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
04 de Agosto de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho..

À Maria Rosa Nogueira Batista e Vidercílio Batista da Silva, meus guias, meus espelhos, meus amores, meus companheiros, meus pais. Obrigada por toda força e todo empenho por minha educação. Obrigada por me ensinarem os valores reais na vida, pela luz, pelo amor, pelo caráter, pela calma, enfim por tudo. Obrigada por sonharem meus sonhos, por lutarem em minhas lutas. Todas as conquistas em minha vida, não são minhas, são nossas. Obrigada por todos os ensinamentos mas, acima de tudo, obrigada por me darem a oportunidade de tê-los como pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por sempre ter traçado caminhos iluminados para minha vida e por todas as oportunidades maravilhosas.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Paula Rahal, pelo voto de confiança, e por me acolher em seu grupo tão conciso e com tanto a oferecer. Pelos conhecimentos científicos e em especial agradeço pelo crescimento pessoal.

Ao meu co-orientador, Dr. Bruno Moreira Carneiro, agradeço por toda paciência, dedicação, ajuda e conhecimentos transmitidos. Em especial um agradecimento para os momentos de sufoco.

À amiga e companheira de trabalho, Ana Cláudia Silva Braga, por dividir comigo não só os conhecimentos adquiridos, mas os bons e maus momentos. Agradeço também o apoio.

Às queridas, Bru e Bia pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, com destaque para o auxílio da manutenção da saúde mental. Vocês ficam para sempre.

Aos amigos de laboratório e de almoço pelos momentos de choque de realidade, mas especialmente pelos momentos de descontração.

A todos os companheiros de trabalho do LEGO pelas ideias, discussões e convívio diário. E a Lê, por “segurar a barra” durante tempos difíceis.

Aos professores do IBILCE pelo conhecimento transmitido em todos esses anos.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais agradeço imensamente por existirem em minha vida. Por todo esforço, amor e coragem. Pelo estímulo e ponderação, mas em especial pelo equilíbrio transmitido. Amo imensamente vocês!

A meu namorado Cecílio, agradeço por toda dedicação, paciência e carinho. Agradeço também pelo estímulo constante, compreensão e amor incondicionais. Mas acima de tudo, pelo companheirismo e até experimentos realizados no desenvolvimento desse projeto.

A meus irmãos, Allan e Simoni, agradeço pela presença constante, ombro amigo, pelas “loucuras” e momentos de descontração.

Às minhas sobrinhas, por mostrarem em seus pequenos gestos o quão maravilhoso cada simples momento pode ser.

Aos demais familiares, agradeço pelo amor, paciência e por simplesmente apoiarem meus anseios.

A minhas amigas Carol e Té, agradeço por todo apoio mesmo corridinhos ou de longe. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos de longa data, e aos novos também, agradeço por estarem presentes a cada momento simples e por terem feito esse caminho longo do mestrado mais suave. Um lugar especial para vocês para sempre no meu coração.

EPÍGRAFE

*“Quer vencer os desafios? - **Confie em Deus!***

*Quer ser bom no que faz? - **Pratique!***

*Quer alcançar o objetivo? - **Jamais desista!***

*Quer crescer? - **Tenha raízes.***

*Quer ver resultados? **Persevere.***

*Quer ser feliz? - **Esqueça o passado.***

*Quer falar bem? - **Escute melhor.***

*Quer aprender? - **Persista em ler.***

*Quer realização pessoal? - **Sirva!***

*Quer fazer diferença? - **Pague o preço.***

Aqueles que nada fazem e esperam algum tipo de vitória estão enganados.

A vitória é dos que lutam, dos que agem, dos que "saem do porto".

A vitória é dos que se arriscam para alcançar o alto da montanha”

Eliezer Pereira

RESUMO

A hepatite C é a inflamação do fígado decorrente da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), frequentemente evolui para quadros crônicos, sendo considerada mundialmente a maior causa de cirrose e carcinoma hepatocelular. O tratamento padrão com PEG-IFN e ribavirina não é efetivo contra alguns genótipos do HCV, possui alto custo e efeitos colaterais severos. Portanto, novos tratamentos vêm sendo buscados. A cafeína vem sendo associada a um efeito benéfico sobre várias doenças hepáticas incluindo a melhora da bioquímica anormal do fígado, cirrose e carcinoma hepatocelular. A cafeína atua diretamente desacelerando a progressão da fibrose, além de melhorar a função de vias celulares hepáticas, dentre elas vias utilizadas durante o ciclo replicativo do HCV. Embora a cafeína tenha demonstrado efetividade no controle de doenças hepáticas e interação direta com vias celulares utilizadas pelo HCV, não há na literatura correlação direta entre o efeito da cafeína e as etapas do ciclo replicativo do HCV. Assim, o presente estudo propôs estabelecer a relação direta entre a cafeína e sua capacidade inibitória sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo completo do HCV. Para esse estudo foram utilizados o replicon subgenômico SGR-JFH-FEO, os replicons completos FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi e JFH-1 e a linhagem celular Huh-7.5. A expressão viral foi avaliada por ensaios de Luciferase, Western Blotting, Imunofluorescência indireta e qPCR. A cafeína demonstrou inibição da replicação viral em todos os níveis avaliados, apresentando IC₅₀ de 0.7263 mM e atingindo em concentrações seguras, inibição máxima da replicação de HCVcc em torno de 79 %. A cafeína demonstrou ainda inibição de 30 % sobre a entrada quando aplicada em conjunto ao sobrenadante infeccioso. Entretanto, essa inibição dobra quando há a exposição das partículas à cafeína previamente à introdução em cultura de células, possivelmente havendo interação entre a cafeína e alguma proteína viral. Por outro lado, não houve influência da cafeína sobre o processo de liberação viral.

Palavras-chave: HCV. Antivirais. Huh-7.5. Cafeína

ABSTRACT

Hepatitis C is the liver inflammation arising from hepatitis C virus (HCV) infection, often evolves to chronic conditions and has been considered the major world cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Standard treatment using PEG-IFN and ribavirin is not effective against some HCV genotypes, besides that it has high cost and severe side-effects. Therefore, new treatments have been sought. Caffeine has been found to have beneficial effect in several liver disorders, including the improvement of abnormal liver biochemistry, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Caffeine acts directly by delaying fibrosis, beyond improving the function of liver cellular pathways and interfering with pathways used by the HCV replication cycle. Although, the caffeine showed positive effects for liver disorders and a direct interaction with cell pathways used by HCV, there is no evidence of a direct correlation between caffeine and HCV replication cycle. Thus, the current study proposed to establish the direct relationship between caffeine and different steps of HCV replication cycle. To this study, it was used the subgenomic replicon SGR-JFH-FEO, the full-length replicons FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi and JFH-1; and Huh-7.5 cell line. The viral expression was evaluated by Luciferase, Western blotting, Indirect immunofluorescence and qPCR. The caffeine demonstrated to be able to inhibit viral replication on different stages of viral replication, demonstrating an IC₅₀ value of 0.7263 mM and reaching on safe concentrations, HCVcc maximal replication inhibition around 79 %. Caffeine demonstrated also 30 % of inhibition on viral entry on host cells when tested in combination with infectious supernatant. Moreover, this inhibition increased two fold when particles were exposed to caffeine before introduction on cell culture, possibly, indicating an interaction between caffeine and viral proteins. On the other hand, there is no influence of caffeine on viral secretion process.

Keywords: HCV. Antivirals. Huh-7.5. Caffeine

SUMÁRIO

Capítulo I

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Aspectos gerais da Hepatite C | 17 |
| 1.2 Vírus da hepatite C | 17 |
| 1.2.1 Descoberta, Classificação e Organização do Genoma | 17 |
| 1.2.2 Heterogeneidade genética e distribuição | 23 |
| 1.2.3 Ciclo replicativo | 26 |
| 1.2.4 Modelos para o estudo do HCV <i>in vitro</i> | 27 |
| 1.2.5 Vias de transmissão e tratamentos disponíveis | 30 |
| 1.2 Fitoquímicos de ação terapêutica e cafeína | 32 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 35 |
| 3 OBJETIVOS | 36 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

Capítulo II

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 1 ARTIGO CIENTÍFICO 1 | 45 |
|------------------------------------|-----------|

Capítulo III

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 1 ARTIGO CIENTÍFICO 2 | 45 |
|------------------------------------|-----------|

Capítulo IV

| | |
|---|-----------|
| 1 DISCUSSÃO | 85 |
| 2 CONCLUSÃO | 89 |
| 3 PROBLEMAS E PERSPECTIVAS | 89 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Capítulo I..... | 16 |
| Figura 1: Estrutura da partícula viral e do genoma do HCV | 23 |
| Figura 2: Prevalência mundial do HCV e distribuição geográfica dos genótipos | 25 |
| Figura 3: Ciclo Replicativo do HCV | 27 |
| Figura 4: Estrutura esquemática dos replicons do HCV..... | 29 |
| Capítulo II..... | 44 |
| Figura 1: Análise da viabilidade de células Huh-7.5 sob tratamento com cafeína .. | 61 |
| Figura 2: Efeito inibitório da cafeína sobre a replicação do HCV em 48 h | 62 |
| Figura 3: Análise do efeito da cafeína sobre o padrão de ciclo celular da Huh-7.5 | 63 |
| Figura 4: Análise do perfil apoptótico de Huh-7.5 tratadas com cafeína por 48 h.. | 64 |
| Figura 5: Análise do perfil autofágico de Huh-7.5 tratadas com cafeína por 48 h .. | 65 |
| Figura S1: Efeito inibitório da cafeína sobre a replicação do HCV em 24 h | 66 |
| Figura S2: Análise do perfil apoptótico de Huh-7.5 tratadas com cafeína por 24 h | 68 |
| Capítulo III..... | 69 |
| Figura 1: Perfil citotóxico da cafeína sobre a linhagem Huh-7.5/SGR-JFH-FEO | 81 |
| Figura 2: Efeito inibitório da cafeína sobre a entrada do HCV | 82 |
| Figura 3: Efeito inibitório da cafeína sobre a liberação do HCV em 48 h..... | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Capítulo III | 69 |
| Tabela 1: <i>Primers</i> e sondas utilizados em amplificação para ensaio de qPCR | 80 |

LISTA DE ABREVIações

- ALT - Alanina aminotransferase, do Inglês *Alanine aminotransferase*
- ANOVA - Análise de Variância, do Inglês *Analysis of Variance*
- ASP - Aspartato aminotransferase, do Inglês *Aspartate aminotransferase*
- BCA - Ácido bicincônico, do Inglês *Bicinchoninic acid*
- C - Proteína do capsídeo do vírus da Hepatite C, do Inglês *Core protein*
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CD81 - Cluster de Diferenciação 81, do Inglês *Cluster of Differentiation 81*
- CLDN - Claudina, do Inglês *Claudin*
- CLDN1 - Claudina 1, do Inglês *Claudin 1*
- COX-2 - Ciclooxygenase 2, do Inglês *Cyclooxygenase-2*
- CsA - Ciclosporina A, do Inglês *Cyclosporine A*
- DAAs - Antivirais de Ação direta, do Inglês *Direct-acting antiviral agents*
- DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbeco, do Inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- E1 - proteína do envelope 1 do vírus da hepatite C, do Inglês *Envelope protein 1*
- E2 - proteína do envelope 2 do vírus da hepatite C, do Inglês *Envelope protein 2*
- EGCG - Epigallocatequina-3-galato, do Inglês *Epigallocatechin-3-Gallate*
- EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico, do Inglês *Epidermal growth factor receptor*
- EphA2 - Precursor do receptor 2 de efrina tipo-A, do Inglês *Ephrin type-A receptor 2 precursor*
- ERK - Quinase regulada por sinal extracelular, do Inglês *Extracellular signal-regulated kinase*
- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FBS - Soro Fetal Bovino, do Inglês *Fetal Bovine Serum*
- FEO - Fusão de *Firefly* e Neomicina, do Inglês *Firefly and Neomicin*
- FFU - Unidade Formadora de Foco, do Inglês *Focus-Forming Units*
- FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi – Quimera replicon completo J6/JFH1
- G418 – Geneticina
- GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do Inglês *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- HCC - carcinoma hepatocelular, do inglês *Hepatocellular Carcinoma*

HCV - Virus da Hepatite C, do Inglês *Hepatitis C virus*

HCVcc - Virus da Hepatite C derivado de cultura de células, do Inglês *cell-culture-derived HCV*

HEPES - tampão de Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico, do Inglês *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HSP90 - proteína de choque térmico 90, do inglês *Heat Shock Protein 90*

Huh - Hepatoma humano, do Inglês *Human hepatoma*

HVR1 - Região hipervariável 1 , do Inglês *Hypervariable region 1*

HVR2 - Região hipervariável 1 , do Inglês *Hypervariable region 2*

IC50 - Concentração inibitória de 50 %, do Inglês *half-maximal inhibitory concentration*

ICTV - Comitê Internacional em Taxonomia de Virus, do Inglês *International Committee on Taxonomy Viruses*

IFN- α - Interferon alpha

IRES - Sítio interno de entrada ribossomal, do Inglês *Internal ribosome entry site*

ISG - Genes estimulados por Interferon, do Inglês *Interferon stimulated gene*

JFH-1 - Replicon completo do vírus da Hepatite C “Hepatite Japonesa Fulminante 1”, do Inglês “*Japanese Fulminant Hepatitis 1*”

LDL-R - Receptor de Lipoproteína de baixa densidade, do Inglês *Low-Density Lipoprotein Receptor*

M.O.I - Multiplicidade de Infecção, do Inglês *Multiplicity of Infection*

MEK - Quinase da Proteína quinase mitogeno-ativada, do Inglês *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MTT - Dimetil tiazolio 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NK - Matadoras naturais, do Inglês *Natural Killer*

NPT - Neomicina fosfotransferase, Neomycin phosphotransferase

NS - Proteínas Não estruturais, do Inglês *Non-structural proteins*

NTP - Nucleotídeo Trifosfato, do Inglês *Nucleotide Triphosphate*

NTPase - Nucleotídeo trifosfatase, do Inglês *Nucleotide triphosphatase*

NTRs - Regiões não traduzíveis, do Inglês *non-translated regions* (sinônimo de UTRs)

OCLN - Ocludina, do Inglês *Occludin*

ORF - Quadro aberto de leitura, do Inglês *Open Reading Frame*

P7 - Proteína 7

PBS - Tampão fosfato salino, do Inglês *Phosphate buffered saline*

PEG - Polietilenoglicol
PEG-IFN - Interferon Peguilado
pH - Potencial Hidrogeniônico
PHH - Hepatócitos humanos primários, do Inglês *Primary human hepatocytes*
PKA - Proteína quinase A, do Inglês *Protein Kinase A*
qPCR - PCR em tempo Real
Ras – Proteína Sarcoma de rato, do Inglês *Rat Sarcoma protein*
RBV - Ribavirina
RE - Retículo Endoplasmático
RLuc - *Renilla* Luciferase
RNA - Ácido Ribonucleico, do Inglês *Ribonucleic Acid*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SGR-JFH-FEO ou SGR-Feo JFH-1 - Replicon subgenômico do JFH-1
SGR-Neo-Con1 - Replicon Subgenômico do Con1
SR-BI - Receptor Scavenger Classe B tipo I, do Inglês *Scavenger Receptor Class B Type I*
TBS-T - Tampão Tris-Tween, do Inglês *Tris-Buffered Saline and Tween 20*
WHO – Organização Mundial de Saúde, do Inglês *World Health Organization*

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Hepatite C

A hepatite C é a inflamação do fígado decorrente da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV). Essa infecção causa inicialmente hepatite aguda, a qual é frequentemente subclínica podendo evoluir para um quadro crônico. A evolução para a cronicidade ocorre em aproximadamente 80 % dos casos (LAVANCHY, 2011) e dentre esses pacientes crônicos, 70 % desenvolvem algum tipo de patologia no fígado das quais 5 a 20 % corresponde à cirrose hepática (ASHFAQ *et al.*, 2011) sendo que de 1 a 5 % morrem de cirrose ou hepatocarcinoma (WHO, 2013). A evolução para hepatocarcinoma ocorre em cerca de 30-50 % dos pacientes cirróticos após aproximadamente 10 anos da infecção (GIANNINI; BRECHOT, 2003).

Essa doença é de grande importância para a saúde pública visto que, a cada ano, mais de 350 mil óbitos são relacionados à cirrose, doenças hepáticas em estágio terminal e do carcinoma hepatocelular (HCC) associadas a esta infecção (CHEVALIEZ; PAWLITSKY, 2007; WHO, 2013). Estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam infectadas cronicamente pelo vírus (WHO, 2013) e que cerca de três a quatro milhões de novos casos surjam a cada ano (WHO, 2013).

1.2 Vírus da hepatite C

1.2.1 Descoberta, Classificação e Organização do Genoma

O HCV foi identificado em 1989 por Choo e colaboradores e desde então vários trabalhos subsequentes elucidaram a organização e a diversidade do vírus (CHOO *et al.*, 1991; MATSUURA; MIYAMURA, 1993; THIMME; BINDER;

BARTENSCHLAGER, 2012). O HCV é classificado como membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Hepacivirus* (ICTV, 2013). São vírus envelopados, com capsídeo icosaédrico e aproximadamente 50 nm de diâmetro (Figura 1a), cujo genoma de cerca de 9.6 Kb corresponde a uma cadeia simples e linear de RNA com polaridade positiva contendo uma única fase aberta de leitura (*ORF - open reading frame*); que codifica uma poliproteína precursora de 3.011 aminoácidos, flanqueada por duas regiões terminais não codificantes (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013). Esta poliproteína é co - e pós-traducionalmente processada por proteases virais e celulares em dez proteínas, estruturais (C, E1, E2/p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013).

As regiões não traduzíveis (*non-translated regions - NTRs*) são necessárias tanto para a tradução da proteína quanto para a replicação do vírus. A região 5'NTR é uma porção altamente estruturada do genoma viral. Composta por cerca de 340 nucleotídeos, essa região contém um sítio de entrada ribossomal interno (IRES) que direciona a tradução cap-independente da *ORF*, sendo essencial à tradução do RNA viral (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Esta região também apresenta alto grau de conservação entre os diferentes genótipos, apresentando geralmente mais de 90 % de similaridade entre as diferentes sequências (BUKH *et al.*, 2010). Possui quatro domínios altamente conservados numerados de I a IV sendo que os domínios I e II estão envolvidos na replicação viral (FRIEBE *et al.*, 2001). A região 3'NTR é composta por uma curta região variável com cerca de 40 nucleotídeos; uma sequência poli U com um comprimento médio de 80 nucleotídeos; e um

elemento invariável de 98 nucleotídeos designado cauda X (LINDENBACH; RICE, 2005).

As proteínas estruturais encontram-se presentes na região amino-terminal da poliproteína e são os principais constituintes das partículas virais infecciosas (THIMME; BINDER; BARTENSCHLAGER, 2012). Segundo Penin *et al.* (2004), a proteína do capsídeo (C) é uma proteína básica constituída pelos primeiros 191 aminoácidos da poliproteína, sendo a proteína viral mais conservada e correspondendo à segunda região mais conservada do genoma. Unidades repetitivas dessa proteína compõem o nucleocapsídeo viral, encapsulando o genoma e sendo essencial para a montagem das partículas virais. A proteína do capsídeo se localiza no citoplasma, onde se encontra ligada ao Retículo endoplasmático, podendo ainda apresentar-se, em menor proporção, no núcleo. Já foi demonstrado que esta proteína pode estar envolvida na modulação da transcrição de genes, proliferação celular, apoptose e sinalização celular, podendo interferir no metabolismo de lipídeos e na supressão da resposta imune (PENIN *et al.*, 2004).

As proteínas E1 e E2 aparecem em tandem, subsequentes à proteína do core (VIEYRES; DUBUISSON; PIETSCHMANN, 2014). E1 e E2, denominadas proteínas do envelope, são glicoproteínas transmembrânicas associadas ao envelope viral e formam um heterodímero essencial para a entrada do vírus na célula, contudo ainda não está clara a necessidade desse heterodímero para a montagem da partícula viral (VIEYRES; DUBUISSON; PIETSCHMANN, 2014). Recentemente foi demonstrado que a proteína E2 corresponde a uma estrutura globular (FAUVELLE; FELMLEE; BAUMERT, 2014). Essas proteínas são consideradas essenciais para a infecção viral sendo que para a E2, são

encontradas duas regiões hipervariáveis (HVR1 e HVR2) envolvidas na subversão do sistema imune (WEINER *et al.*, 1991) além de possivelmente realizar uma ligação cruzada com CD81 e inibir células *Natural Killer* (NK) (THIMME; BINDER; BARTENSCHLAGER, 2012). Acredita-se que a E1 seja responsável por mediar a fusão com a membrana plasmática, enquanto têm sido demonstrado que a E2 é responsável pela ligação direta aos receptores celulares da célula hospedeira (ROTHWANGL; RONG, 2009).

A região p7 codifica uma proteína integral de membrana com 63 aminoácidos que é composta por duas α -hélices. O arranjo dessa proteína é realizado em hexâmeros ou heptâmeros com propriedades indicativas de canal iônico, sendo associadas ao grupo proteico das viroporinas (STEINMANN *et al.*, 2007; CHANDLER *et al.*, 2012). A função exata da proteína p7 ainda não é conhecida, mas existem evidências de que esta atue, assim como a NS2 na montagem do vírion e também na liberação viral (THIMME; BINDER; BARTENSCHLAGER, 2012; BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013). Tem se aceitado a hipótese de que a proteína p7 controle a permeação de H^+ e possa atuar evitando a acidificação precoce das vesículas de transporte contendo o vírus ainda imaturo, visto que vírions maduros são ácido-estáveis, entretanto vírus intracelulares podem ser inativados por pH ácido (WOZNIAK *et al.*, 2010). Essa proteína também tem sido elucidada na prevenção de modificações precoces na conformação das proteínas do envelope para a entrada viral (WOZNIAK *et al.*, 2010).

A primeira proteína não-estrutural é a NS2, sendo transmembrânica, com cerca de 217 aminoácidos, e estando ancorada ao retículo endoplasmático (LINDENBACH; RICE, 2005). Essa proteína aparece associada à proteína

NS3, formando uma cisteíno-protease NS2/NS3 autocatalítica (Figura 1b), sendo responsável pela clivagem da junção NS2/NS3 e pela maturação das outras proteínas não-estruturais (LINDENBACH; RICE, 2005; SCHREGEL *et al.*, 2009).

A NS3 é uma proteína multifuncional constituída de um domínio N-terminal serino-protease e um domínio C-terminal RNA helicase/NTPase. A serino protease forma um complexo estável com o co-fator NS4A e catalisa a clivagem da poliproteína nos sítios NS3-4A; NS4A-B, NS4B-5A e NS5A-5B (THIMME; BINDER; BARTENSCHLAGER, 2012; BARTENHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013) (Figura 1b). A helicase/NTPase usa a energia da hidrólise de NTP possivelmente para desenrolar a dupla fita de RNA intermediária na direção 3'→ 5' formada durante a replicação, para eliminar estruturas secundárias de RNA ou para separar o ácido nucleico associado a proteínas (ASHFAQ *et al.*, 2011) . Esta função do HCV não é bem conhecida, mas pode estar envolvida na iniciação da síntese de RNA durante a replicação (LINDENBACH; RICE, 2005).

O polipeptídeo NS4A funciona como um co-fator para a proteína NS3, formando um complexo NS3/NS4A (BARTENHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013). Outra função atribuída a esta proteína é a participação na hiperfosforilação de NS5A (MACDONALD; HARRIS, 2004).

NS4B é uma proteína altamente hidrofóbica, que desempenha um importante papel no recrutamento de outras proteínas virais. Interage com a proteína NS4A e indiretamente com a NS3 e NS5A (EGGER *et al.*, 2002). Estudos de microscopia eletrônica indicaram que a NS4B induz mudanças morfológicas no retículo endoplasmático, formando uma estrutura denominada

rede membranosa, em adição todas as proteínas virais foram encontradas nesse local, sugerindo um sítio para a formação do complexo replicativo (EGGER *et al.*, 2002). Recentemente foi sugerido que a formação da rede membranosa não é mediada exclusivamente pela NS4B e que possivelmente necessite de todas as replicases (ROMERO *et al.*, 2012).

NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica organizada em três domínios (I; II e III). Entre as proteínas não estruturais do HCV, a NS5A é a que apresenta maior interação com o hospedeiro e existem evidências para um papel desta proteína em antagonizar a resposta imune inata do hospedeiro, interagindo com inúmeras vias de transdução de sinal (HWANG *et al.*, 2010). Além dessas diversas influências sobre a célula hospedeira, a NS5A está envolvida na replicação e montagem do HCV, sendo capaz de interagir independentemente com todas as proteínas não-estruturais do vírus (MACDONALD *et al.*, 2004).

A proteína NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA. A estrutura do centro ativo dessa enzima pode ser comparada a uma mão, com “palma”, “polegar” e os “outros dedos”. O sítio ativo da polimerase é altamente conservado e está localizado no subdomínio “palma” (BARTENCHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013). Essa enzima é, portanto, responsável pela replicação do material genético do vírus que dará origem aos novos vírions, sendo atualmente considerada como um importante alvo para a terapia antiviral (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; BARTENCHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013).

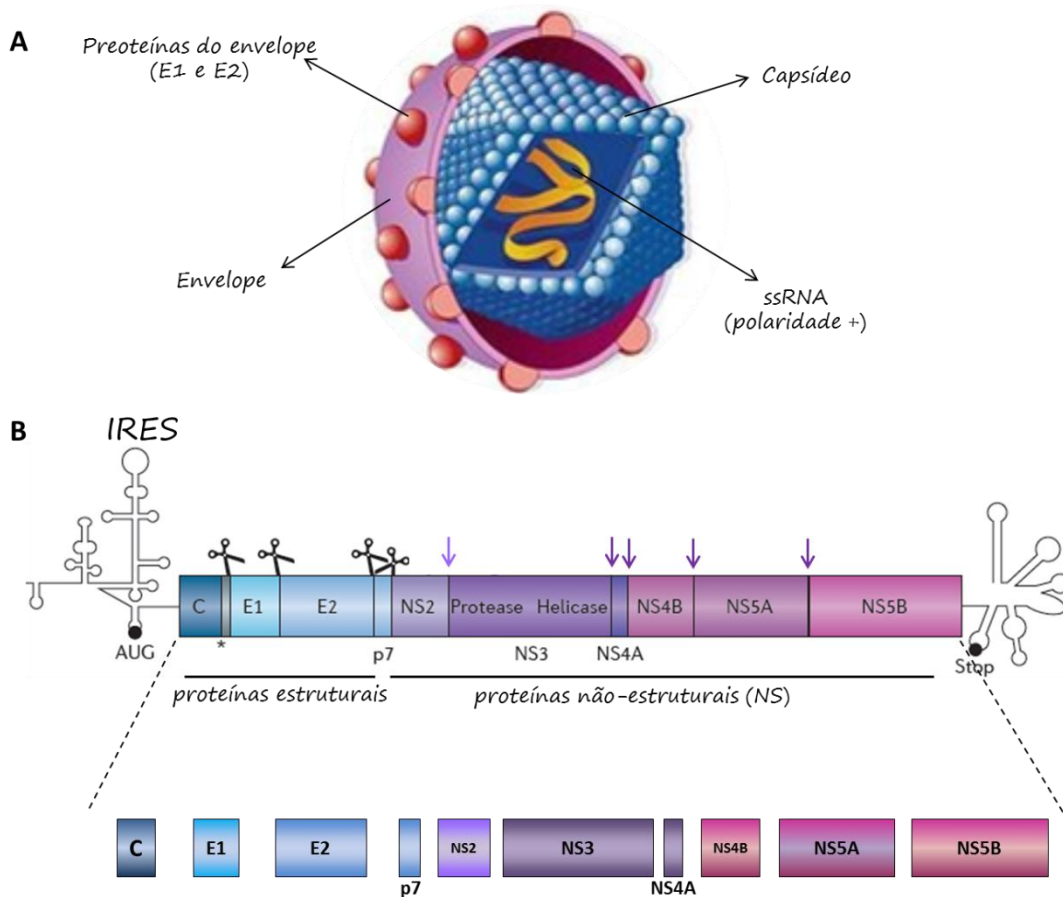


Figura 1: A) Representação esquemática da morfologia da partícula viral demonstrando as proteínas do core arranjadas em unidades repetitivas formando um capsídeo icosaédrico, bem como as proteínas E1 e E2 associadas ao envelope viral (constituintes estruturais do vírus) e o RNA viral como uma fita simples linear - Adaptado de JAMES, 2001. B) Estrutura do genoma viral e do processamento da poliproteína - Adaptado de BARTENCHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013.

1.2.2 Heterogeneidade genética e distribuição

O HCV apresenta grande variedade genotípica e a comparação de sequências nucleotídicas de variantes do vírus obtidas de diferentes indivíduos, em regiões geográficas diversas, demonstrou a existência de pelo menos sete grupos geneticamente distintos (genótipos 1 a 7) (KUIKEN; SIMMONDS, 2009). Esses genótipos diferem entre si de 31 % a 34 % na composição da sequência

de nucleotídeos e cerca de 30 % na sequência de aminoácidos quando considerado o genoma completo (SUZUKI *et al.*, 2005). Cada um desses genótipos pode ser subdividido em vários subtipos, identificados por letras minúsculas (a, b, c, etc.), que diferem entre si em 20 – 25 % na sequência de nucleotídeos (PAWLOTSKY, 2003; SIMMONDS, 2004). Durante a replicação, devido à infidelidade inerente da polimerase viral, cada progênie de RNA contém mutações que levam a uma contínua diversificação da população viral, conseqüentemente o HCV circula *in vivo* na forma de quasispécies (FARCI *et al.*, 2011), genomas que diferem entre si de 1 a 5 % (DAVIS, 1999). Algumas regiões do genoma estão mais ou menos propensas à presença de variações como as regiões gênicas E1 e E2 com maior variabilidade e regiões como 5' NTR e core que aparecem como as regiões mais conservadas do genoma (DI BISCEGLIE; HOOFNAGLE, 2002).

Os genótipos 1 e 2 estão distribuídos por todo o mundo, o genótipo 3 é mais comum no Sul e Sudeste Asiático, o genótipo 4 predominante na África (excetuando a África do Sul que apresenta prevalência do genótipo 5) e no Oriente Médio, o genótipo 6 aparece principalmente em Hong Kong e Vietnam (KIM; SAAB, 2005). No Brasil, os genótipos 1 e 3 são os mais frequentes, sendo que há prevalência do genótipo 1 (64,9 %), seguido pelo genótipo 3 (30,2 %) e 2 (4,6 %) (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; KERSHENOBICH *et al.*, 2011) (Figura 2).

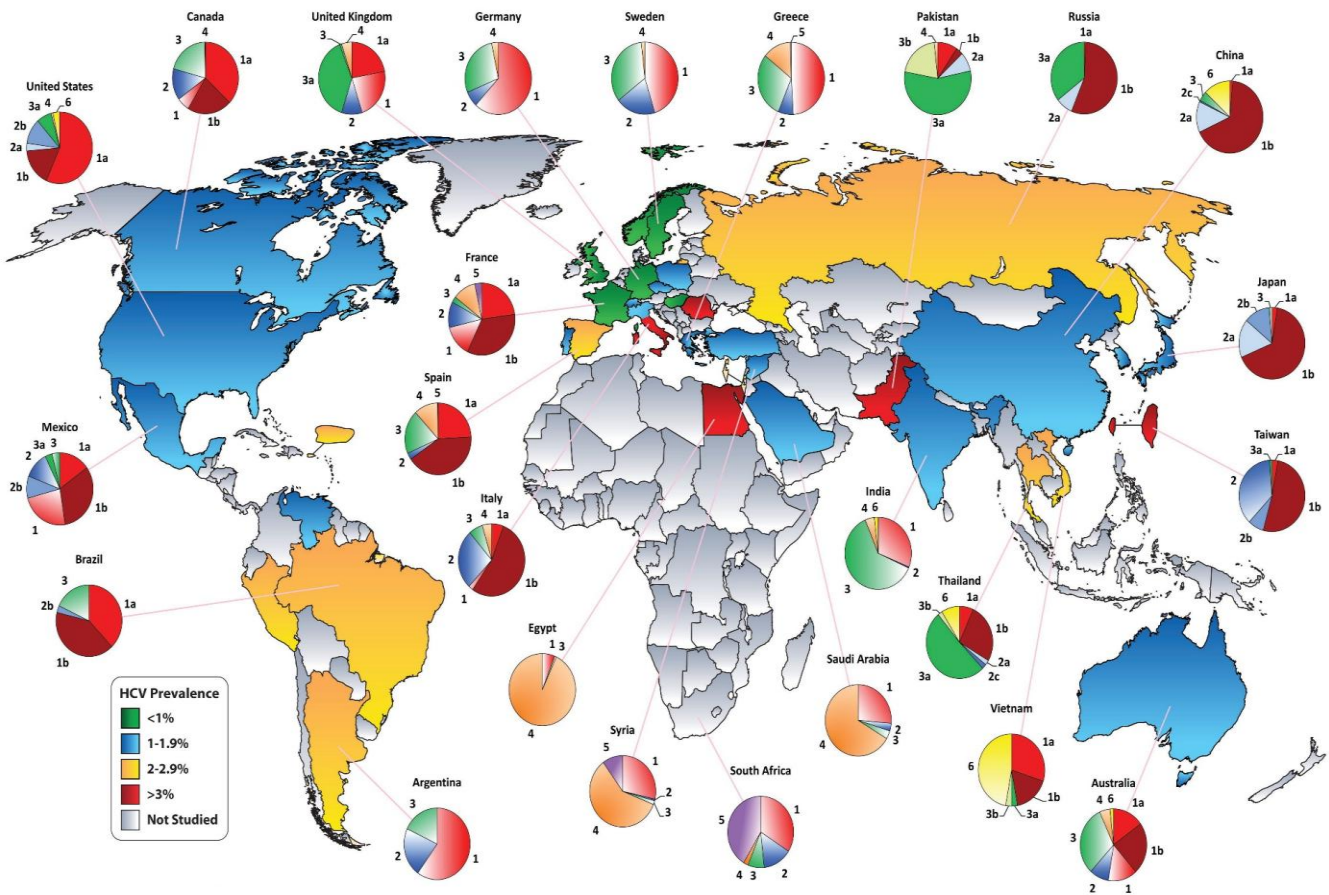


Figura 2: Distribuição geográfica mundial dos genótipos do HCV. Fonte: Adaptado de NEGRO; ALBERTI, 2011

A grande diversidade na sequência do genoma do HCV é decorrente dos altos níveis de replicação do vírus e a baixa fidelidade da RNA polimerase codificada pelo vírus, a qual não possui atividade corretiva e acumula cerca de 10^4 modificações nucleotídicas por sítio ao ano (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000).

1.2.3 Ciclo replicativo

Partículas virais circulantes associadas a lipoproteínas de alta e baixa densidade são reconhecidas e tem a entrada na célula hospedeira mediada por receptores/ co-receptores de superfície celular, como receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R), Scavenger Receptor Classe B tipo I (SR-BI), a tetraspanina Diferenciação celular 81 (CD81), claudinas (CLDN) e ocludinas (OCLN) (TANG; GRISE, 2009). O reconhecimento das partículas virais pelos receptores celulares é mediada pelas proteínas do envelope E1 e E2. Após essa sequência de reconhecimento de receptores, finalmente ocorre entrada na célula por endocitose mediada por receptor (BARTENHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013). Na sequência, o endossoma formado sofre acidificação, o que induz a fusão das glicoproteínas da membrana e consequente liberação do genoma viral no citosol da célula hospedeira (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Após a liberação do material genético, o IRES promove a iniciação da tradução da poliproteína que segue com a produção das proteínas virais. As proteínas estruturais associam-se (core) ou integram-se (E1, E2 e p7) com a membrana do retículo endoplasmático (RE) e formam oligômeros funcionais que promoverão a montagem da nova partícula viral. As proteínas não estruturais se associam do lado citoplasmático da membrana do RE onde interagem entre si e com as proteínas da célula hospedeira para formar a maquinaria de replicação viral. Essa maquinaria usa seu próprio genoma como molde para transcrição de fita complementar negativa de RNA. Essa fita negativa, por sua vez, serve como uma molécula replicativa intermediária na síntese de uma nova molécula de RNA de polaridade positiva que pode ser usada para tradução, replicação ou então ser

empacotada para constituir novos vírus (DE FRANCESCO *et al.*, 2003). O esquema do ciclo replicativo do HCV está representado na figura 3.

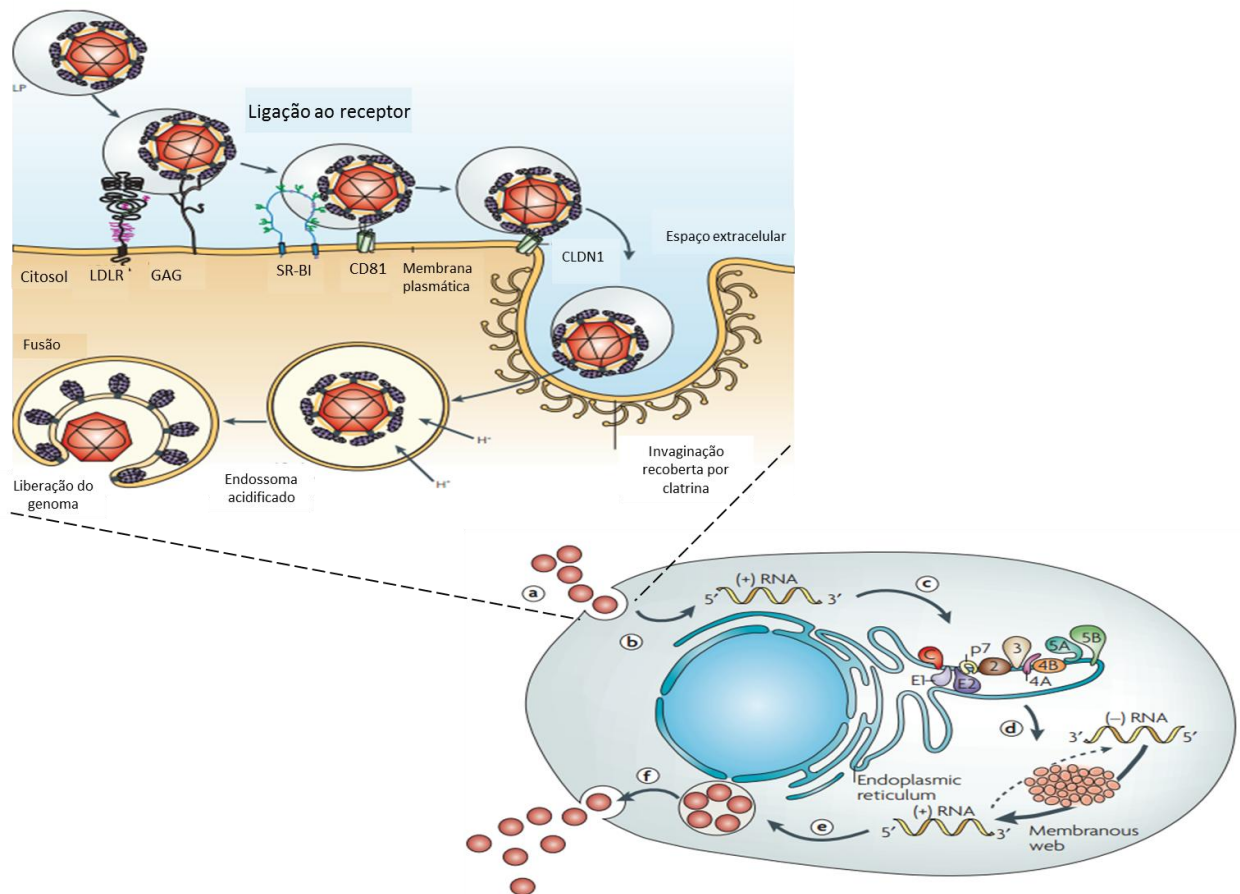


Figura 3: Ciclo Replicativo do HCV. (a) Internalização do vírus na célula. (b) Liberação citoplasmática. (c) Tradução e processamento da poliproteína. (d) Replicação do RNA viral. (e) Montagem da partícula viral. (f) Maturação e liberação dos vírions. Fonte: Adaptada de MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M., 2007.

1.2.4 Modelos para o estudo do HCV *in vitro*

Desde a identificação do vírus da hepatite C em 1989, a ausência de um sistema de cultura de células confiável para estes vírus vinha dificultando a pesquisa com este importante patógeno humano (DUVERLIE; WYCHOWSKI, 2007). Um grande avanço para os estudos foi o desenvolvimento de um

sistema de replicação *in vitro* com a construção de replicons sub-genômicos capazes de se auto-replicar em culturas de células de hepatoma humano (Huh-7) (LOHMANN *et al.*, 1999). Replicons são construções genômicas e sub-genômicas que expressam o complexo de replicase viral e são capazes autonomamente de realizar a replicação viral (DUVERLIE; WYCHOWSKI, 2007). Os primeiros replicons subgenômicos eram derivados do clone CON1, genótipo 1b, e, eram moléculas de RNA bicistrônicas que possuíam o gene da neomicina fosfotransferase (NPT) e os genes não estruturais, codificantes das proteínas requeridas para a replicação do RNA do HCV (NS3-NS5B) (SGR-Neo-Con1) (LOHMANN *et al.*, 1999).

Com o avanço do conhecimento no desenvolvimento de replicons, foram desenvolvidas algumas variações do genoma original do clone CON1 e mais tarde clones provenientes do genótipo 2 foram desenvolvidos. O replicon subgenômico SGR-JFH-FEO é um replicon subgenômico bicistrônico que contém os genes não estruturais do clone do HCV genótipo 2a (JFH-1) (WAKITA *et al.*, 2005) e que possui o gene *Firefly* Luciferase associado a um gene de resistência à neomicina (FEO) (WYLES *et al.*, 2009) (Figura 4a).

Um grande avanço no estudo do HCV foi a identificação do isolado altamente infeccioso JFH-1 (*japanese fulminant hepatitis* – hepatite japonesa fulminante) genótipo 2a, que é capaz de produzir eficientemente partículas virais infecciosas em cultura de células e provocar infecção em chimpanzés (WAKITA *et al.*, 2005; ZHONG *et al.*, 2005). Análises comparativas das polimerases virais codificadas pelo JFH-1 e pelo isolado J6 (isolado semelhante ao JFH-1) demonstrou que a polimerase do JFH-1 inicia a replicação mais eficientemente, resultando em uma melhor replicação *in vitro*

(SIMISTER *et al.*, 2009). Existem ainda quimeras associando genomas completos do HCV, a exemplo do FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi, um genoma monocistrônico completo do HCV que corresponde a uma quimera dos clones J6 e JFH-1 derivado de um sistema infeccioso previamente descrito do genótipo 2a denominado J6/JFH (LINDENBACH *et al.*, 2005) associado ao gene de *Renilla* Luciferase (RLuc) (Figura 4b) (TSCHERNE *et al.*, 2006)

A linhagem celular que apresenta-se atualmente mais permissiva à infecção por partículas de HCV derivada de cultura de células (HCVcc), é a linhagem Huh-7.5. Essa corresponde a uma linhagem de hepatoma humano derivada da linhagem Huh-7, a qual expressava estavelmente um replicon genótipo 1b e que foi tratada e curada da infecção por IFN- α . Estudos posteriores ao tratamento demonstraram que essa linhagem era defectiva do gene RIG-1, um dos responsáveis pela ativação da via do IFN (SUMPTER *et al.*, 2005) e é mais permissiva a reinfeção por RNA do HCV (BLIGHT, MCKEATING; RICE, 2002).

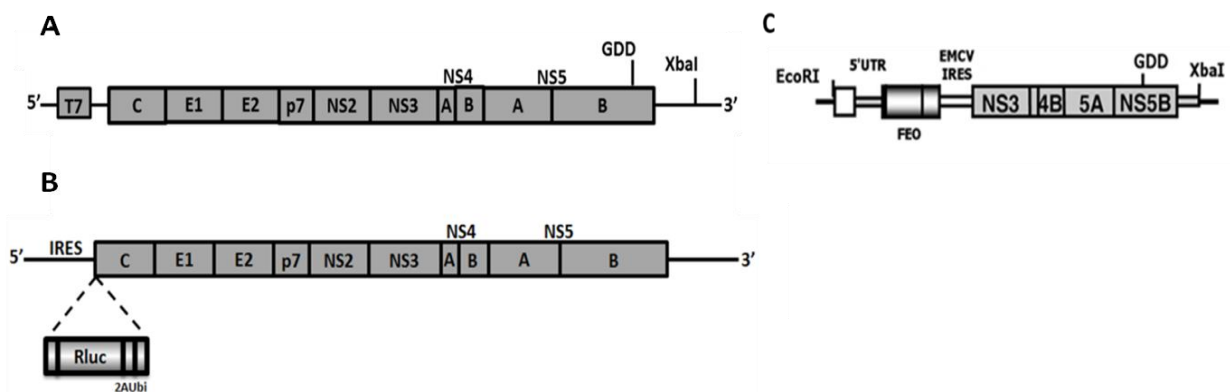


Figura 4: Representação esquemática dos sistemas de replicação utilizados como modelos de estudo *in vitro* do HCV. A) JFH-1: sistema de genoma completo do HCV genótipo 2a, primeiro replicon completo desenvolvido para o HCV (Fonte: Adaptada de WAKITA *et al.*, 2005). B) FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi: sistema de genoma completo do HCV genótipo 2a, associado ao gene de *Renilla* Luciferase (RLuc) (Fonte: Adaptada de: TSCHERNE *et al.*, 2006). C) SGR-JFH-FEO: replicon subgenômico do HCV contendo a porção não estrutural do genoma viral e os genes de resistência à neomicina fundido ao gene de *Firefly Luciferase* (FEO) (Fonte: Adaptada de WYLES *et al.*, 2009).

1.2.5 Vias de transmissão e tratamentos disponíveis

O vírus da hepatite C infecta principalmente os hepatócitos e, diferente dos demais vírus que causam hepatite, não gera resposta imune adequada, tornando a doença aguda menos sintomática (HOOFNAGLE, 2002). Esta característica particular do HCV faz com que a grande maioria dos indivíduos infectados evolua para um quadro crônico, que leva ao desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (WHO, 2013).

O vírus é transmitido eficientemente por exposição percutânea direta ao sangue contaminado e a via de transmissão mais comum antes da identificação do vírus eram os eventos de transfusões sanguíneas (CDC, 1998). Atualmente a principal via de transmissão do vírus relaciona-se ao compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis (WHO, 2013; CDC, 2014).

O tratamento convencional baseia-se na utilização de interferon alfa (IFN- α) ou interferon alfa peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV). O IFN- α tem a capacidade de inibir a replicação do HCV, enquanto o PEG-INF corresponde a um conjugado do INF- α com uma molécula de polietilenoglicol (PEG). Essa associação resulta na diminuição da excreção renal, aumento da meia vida e consequente pressão constante sobre o vírus evitando a replicação viral durante os hiatos imunológicos, como ocorre com o INF- α convencional (MANNNS *et al.*, 2001). A ribavirina é um análogo nucleosídeo sintético com potencial ação antiviral e imunomodulatória (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2007), além disso, já foi demonstrada a capacidade da ribavirina agir diretamente na RNA polimerase viral e na mutagênese, o que resulta na redução da infectividade viral (FELD; HOOFNAGLE, 2005). Sua importância no

tratamento é evidente, contudo os efeitos da ribavirina só são efetivos na terapia conjunta com o INF- α (ROFFI *et al.*,2008). Acredita-se que a ribavirina possa agir induzindo genes ativados pelo interferon (*Interferon-stimulated genes – ISG*) como os fatores 7 e 9, atuando sinergicamente durante a terapia convencional (THOMAS *et al.*, 2011).

Apesar de constituir a terapia mais difundida atualmente, a taxa de resposta virológica sustentada da terapia combinada PEG-INF/RBV foi de 76 - 84 % em pacientes com infecção pelo genótipo 2 ou 3, e de 42 - 52 % em pacientes com HCV do genótipo 1 (PAWLOTSKY, 2006; WOHNSLAND; HOFMANN; SARRAZIN, 2007). Devido à baixa resposta virológica sustentada, os efeitos colaterais e o alto custo do tratamento convencional, novos métodos de controle desta infecção vêm sendo estudados. O desenvolvimento de antivirais de ação direta (*Direct-acting antiviral agents – DAAs*) revolucionou o tratamento contra a hepatite C. Os DAAs são direcionados principalmente para NS3/4A (protease), NS5B (polimerase) e o complexo replicativo (MAUSS *et al.*, 2014). Em 2011, inicialmente aprovado na Europa e Estados Unidos, o uso dos inibidores de protease Boceprevir e Telaprevir, foram adicionados à terapia convencional, visto que o uso isolado desses agentes selecionava rapidamente variantes resistentes, não podendo ser utilizados em conjunto já que apresentam o mesmo alvo e selecionariam resistência-cruzada (MAUSS *et al.*, 2014). Ainda em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o registro do Boceprevir (Victrelis®) no Brasil, o qual aumentaria de 40 % para 60 % as chances de cura para pacientes com o genótipo 1 (BRASIL, 2011). Entretanto, apesar da melhora na resposta, já foi detectada emergência

de mutações virais que conferem resistência a esses medicamentos (HALFON; LOCARNINI, 2011).

1.3 Fitoquímicos de ação terapêutica e cafeína

O uso de produtos naturais na fabricação de drogas é uma prática antiga e bem estabelecida, e o princípio ativo de várias drogas comuns no dia-a-dia foram identificadas a partir de produtos naturais (TZIVELEKA; VAGIAS; ROUSSIS, 2003). Dentre vários produtos naturais com ação antiviral ainda em fase de teste destacam-se contra o vírus da hepatite C, o extrato da raiz e de folhas do gênero *Phyllanthus*, que interagem com a NS3 e NS5B do HCV respectivamente (RAVIKUMAR *et al.*, 2011). Algumas substâncias provenientes de plantas já demonstraram possuir algum efeito na inibição do HCV *in vitro*, dentre eles estão: o polifenol EGCG proveniente do chá verde que atua efetivamente em etapas da entrada viral (CIESEK *et al.*, 2011), bem como epicatequinas fenólicas atuando na replicação viral (LIN *et al.*, 2013), o flavonóide BJ486K proveniente de *Marrubium peregrinum* L (*Lamiaceae*) que demonstrou efetividade contra diversos genótipos do vírus, atuando no bloqueio da entrada viral (HAID *et al.*, 2012), bem como os flavonoides provenientes de extratos de *Embelia ribes* os quais interagem diretamente com a NS3 do HCV (BACHMETOV *et al.*, 2011).

Em relação às várias terapêuticas em análise, o consumo do café (*Coffea* sp.) vem sendo associado, em um grande número de estudos, a um efeito benéfico em relação à bioquímica anormal do fígado, cirrose e carcinoma hepatocelular (CADDEN; PARTOVI; YOSHIDA, 2007; FREEDMAN *et al.*, 2009; COSTENTIN *et al.*, 2011). Nesses estudos registra-se uma redução de até 53 % no risco de progressão de doenças crônicas no fígado em indivíduos que

consomem cerca de três xícaras de café diariamente (FREEDMAN *et al.*, 2009), aproximadamente 408 mg de cafeína; (COSTENTIN *et al.*, 2011). Além disso, o consumo de café foi significativamente associado à diminuição de morte por carcinoma (WAKAI *et al.*, 2007), à redução de mortes em geral e um crescente número de estudos vem sugerindo que a cafeína possa ter diretamente um efeito hepatoprotetor (FREEDMAN *et al.*, 2009; MODI *et al.*, 2010; COSTENTIN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014).

Modi *et al.* (2010) estabeleceram uma associação direta entre o consumo da cafeína, e a redução do desenvolvimento de fibrose hepática. Os resultados mostraram que o aumento do consumo de cafeína estava diretamente relacionado à diminuição do desenvolvimento de fibrose em pacientes portadores de doenças crônicas no fígado. Estes resultados foram particularmente expressivos para pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

Além disso, é sugerido que a cafeína possa interagir com vias celulares que desaceleram a progressão de doenças hepáticas. Dentre elas, a diminuição de alanina aminotransferase (ALT) (RUHL; EVERHART, 2005), fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, bem como aumento de albumina no soro (MODI *et al.*, 2010). A cafeína também atua em vias de detoxificação (TAO *et al.*, 2008) e altera proliferação de células tumorais, induzindo parada de ciclo em G0/G1 (OKANO *et al.*, 2008), apoptose e inibindo a expressão de fatores pró-inflamatórios em hepatócitos (KAWANO *et al.*, 2012). Em adição a isso, a cafeína possui a capacidade de interferir em proteínas celulares utilizadas no ciclo replicativo do HCV, como a redução da expressão de proteínas HSP90 em osteoblastos, diretamente relacionada à

proteína não-estrutural 5 (NS5A) (OKAMOTO *et al.*, 2006; NAKAGAWA *et al.*, 2007; BERAN *et al.*, 2012); redução da fosforilação de algumas proteínas da via Ras-ERK, que interagem diretamente com a proteína NS5B e com a região 5'NTR viral (OKANO *et al.*, 2008; YI *et al.*, 2011; ZEITLIN *et al.*, 2011); bem como já foi demonstrado que a cafeína é capaz de reduzir a fosforilação da ciclooxigenase 2 (COX-2), sendo esta associada frequentemente à capacidade replicativa do HCV (GRETTON; HUGHES; HARRIS, 2010; KANG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2013).

A cafeína é um alcalóide identificado como 1,3,7,trimetilxantina, cuja estrutura contém um esqueleto de purina (DE MARIA; MOREIRA, 2007). Este alcalóide é encontrado em vários tipos vegetais como a semente do café (*Coffea sp.*), onde aparece em grande quantidade; nas folhas de chá verde (*Camilla sinensis*) e em outros produtos vegetais como o guaraná (*Paullinia cupana*), a erva-mate (*Ilex paraguayensis*) (BUCCI, 2000) e o cacau (*Theobroma cocoa*) (CAUDLE *et al.*, 2001). Possui efeito geralmente associado a alterações no sistema nervoso central sendo altamente psicoestimulante (FREEDHOLM *et al.*, 1999). Apesar de terem sido estabelecidas relações inversamente proporcionais entre a cafeína e a evolução de algumas doenças hepáticas como carcinoma hepatocelular (HOSAKA *et al.*, 2001), cirrose (RUHL; EVERHART, 2005) e fibrose (MODI *et al.*, 2010) em pacientes portadores de hepatite C crônica; ainda não foi estabelecida uma relação direta entre a cafeína e o ciclo replicativo do HCV.

2 JUSTIFICATIVA

A hepatite C é uma infecção que frequentemente se apresenta na forma crônica e atinge cerca de 3 % da população mundial. Comumente evolui para uma doença hepática progressiva causando em última instância cirrose e hepatocarcinoma, sendo um dos principais promotores de transplante hepático no mundo. O tratamento atual é feito com interferon e ribavirina, porém a resposta virológica sustentada é de apenas 40 % para portadores do genótipo 1, o mais prevalente no Brasil. As novas estratégias terapêuticas como boceprevir e telaprevir tem um alto custo e efeitos colaterais graves. Esse quadro demonstra a urgente necessidade de terapias mais eficientes contra o HCV.

A cafeína mostra nesse contexto alto potencial, seja do ponto do bem estar paciente/tratamento, seja do ponto de vista econômico uma vez, que afeta vias celulares que melhoram a função de enzimas hepáticas e já demonstrou efeitos na desaceleração da evolução de doenças hepática. Além disto seu consumo foi relacionado a quadros mais brandos de doenças hepáticas frequentemente associadas ao HCV. Também, como um fitoquímico encontrado em diversos tipos vegetais e de isolamento simples e rápido, poderia representar um tratamento mais econômico e ainda podendo ser complementado como enriquecimento na dieta dos pacientes.

Embora já tenha sido relacionada à melhora nas vias metabólicas hepáticas, com destaque para pacientes portadores do HCV, não existem relações diretas entre este fitoquímico e o ciclo replicativo do HCV. Além disso, por apresentar interferência em vias celulares utilizadas na entrada e liberação viral, o estudo do efeito da cafeína no ciclo completo do vírus poderia ampliar o potencial terapêutico desse fármaco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito da cafeína em diferentes etapas do ciclo replicativo do HCV em um sistema permissível a infecção pelo replicon completo do HCV e determinar a eficiência da droga.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma linhagem estável expressando o replicon subgenômico do HCV, SGR-JFH-FEO;
- Estabelecer cultura de células infectadas com o vírus da Hepatite C genótipo 2a e estoque de sobrenadante infeccioso;
- Avaliar o efeito da cafeína na replicação do vírus da hepatite C
- Avaliar a influência da cafeína sobre diferentes mecanismos de morte celular
- Determinar o IC50 do tratamento com cafeína para fins comparativos com outras drogas
- Avaliar o efeito do tratamento com cafeína sobre outras etapas do ciclo viral como entrada e liberação.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHFAQ, U. A. et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. **Virology**, v. 8, p. 161, 2011.

BACHMETOV L, GAL-TANAMY M, SHAPIRA A, VOROBAYCHIK M, GITERMAN-GALAM T, SATHIYAMOORTHY P, GOLAN-GOLDHIRSH A, BENHAR I, TUR-KASPA R, ZEMEL R. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. **J. Viral Hepat.** v.19, p. e81–e88, 2012.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 7, p. 1631-48, Jul 2000.

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. 482-96, Jul 2013.

BERAN, R. K. et al. Cellular growth kinetics distinguish a cyclophilin inhibitor from an HSP90 inhibitor as a selective inhibitor of hepatitis C virus. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30286, 2012.

BLIGHT, K. J.; MCKEATING, J. A.; RICE, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. **J Virol**, v. 76, n. 24, p. 13001-14, Dec 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ ANVISA. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acessado em 07/04/2012.

BUCCI, L. R. Selected herbals and human exercise performance. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2 Suppl, p. 624S-36S, Aug 2000

BUKH, J. et al. Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. **J Infect Dis**, v. 201, n. 9, p. 1381-9, May 1 2010.

CADDEN, I. S.; PARTOVI, N.; YOSHIDA, E. M. Review article: possible beneficial effects of coffee on liver disease and function. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 26, n. 1, p. 1-8, Jul 1 2007.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 1, p. 41-9, Jan 2005.

CAUDLE, A. G.; YIFANG, G.; BELL, L. N. Improved analysis of theobromine and caffeine in chocolate food products formulated with cocoa powder. **Food Res. Int.**, v. 34, p. 599 - 603, 2001.

CDC. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related disease. **MMWR Recomm Rep**, v.47, p.1- 40, 1998.

CDC. Centers for Disease Control And Prevention, 2014

Disponível em: < <http://www.cdc.gov/hepatitis/ChooseC.htm> > Acesso em 13/03/14

CHANDLER DE, PENIN F, SCHULTEN K, CHIPOT C. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. **PLoS Comput Biol.**, v. 8, n. 9, p. e1002702. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002702. Epub, 2012.

CHEN, S. et al. Coffee and non-alcoholic fatty liver disease: Brewing evidence for hepatoprotection? **J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, n. 3, p. 435-41, Mar 2014.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 17, p. 2461-6, May 7 2007.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244, p.359-62, 1989.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER, A.J. BRADLEY, D.W.; KUO, G.; HOUGHTON, M. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.2451-5, 1991.

CIESEK, S. et al. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 1947-55, Dec 2011.

COSTENTIN, C. E. et al. Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v. 54, n. 6, p. 1123-9, Jun 2011.

DAVIS, G. L. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Am J Med**, v. 107, n. 6B, p. 21S-26S, Dec 27 1999.

DE MARIA, C.A; MOREIRA, R.F. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quim Nova**, v.31, n.1, p. 99-105, 2007.

DE FRANCESCO, R. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. **Antiviral Res**, v. 58, n. 1, p. 1-16, Mar 2003.

DI BISCEGLIE, A. M.; HOOFNAGLE, J. H. Optimal therapy of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S121-7, Nov 2002.

DUVERLIE, G.; WYCHOWSKI, C. Cell culture systems for the hepatitis C virus. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 17, p. 2442-5, May 7 2007.

EGGER, D.; WOLK, B.; GOSERT, R.; BIANCHI, L.; BLUM, H.E.; MORADPOUR, D.; BIENZ, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces

distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J Virol**, v. 76, p.5974-84, 2002.

FARCI D. New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. **Semin Liver Dis.**, v. 31, n.4, p. 356-74 doi: 10.1055/s-0031-1297925. Epub, 2011.

FAUVELLE, C.; FELMLEE, D. J.; BAUMERT, T. F. Unraveling hepatitis C virus structure. **Cell Res**, Mar 14 2014.

FARCI et al. New Insights into the HCV Quasispecies and Compartmentalization. **Semin Liver Dis.**, Dec 21 2011.

FELD, J. J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 967-72, Aug 18 2005.

FREEDHOLM, B.B.; BATTIG, K.; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E.E. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n.1, p. 83-133, 1999.

FREEDMAN, N. D. et al. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 50, n. 5, p. 1360-9, Nov 2009.

FRIEBE, P.; LOHMANN, V.; KRIEGER, N.; BARTENSCHLAGER, R. Sequences in the 5'nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. **J. Virol**, v. 75, p. 12047-57, 2001.

GIANNINI, C.; BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ**, v. 10 Suppl 1, p. S27-38, Jan 2003.

GRETTON, S.; HUGHES, M.; HARRIS, M. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signalling. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 3, p. 671-80, Mar 2010.

HAID S, NOVODOMSKÁ A, GENTZSCH J, GRETHE C, GEUENICH S, BANKWITZ D, CHHATWAL P, JANNACK B, HENNEBELLE T, BAILLEUL F, KEPLER OT, POENISCH M, BARTENSCHLAGER R, HERNANDEZ C, LEMASSON M, ROSENBERG AR, WONG-STAAAL F, DAVIOUD-CHARVET E, PIETSCHMANN T. A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 143, n.1, p. 213-22.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.036. 2012.

HALFON, P.; LOCARNINI, S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. **J Hepatol**, v. 55, n. 1, p. 192-206, Jul 2011.

HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S21-9, Nov 2002.

HOSAKA, S.; KAWA, S.; AOKI, Y.; TANAKA, E.; YOSHIZAWA, K.; KARASAWA, Y.; HOSAKA, N.; KIYOSAWA, K. Hepatocarcinogenesis inhibition by caffeine in ACI rats treated with acetylaminofluorene. **Food Chem Toxicol**, v. 39, p. 557-561, 2001.

HWANG, J. et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A: biochemical characterization of a novel structural class of RNA-binding proteins. **J Virol**, v. 84, n. 24, p. 12480-91, Dec 2010.

ICTV – International Committee on Taxonomy Viruses, 2013. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> acessado em: 31/03/14

JAMES, A. Ilustração do vírus da Hepatite C. Disponível em: <<http://www.rit.edu/~japfaa/hcv.jpg>>. Acessado em outubro, 2010.

KANG, C. H. et al. Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-kappaB activation and ERK phosphorylation. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 12, p. 4270-6, Dec 2012.

KANG, N. J. et al. Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 6, p. 921-8, Jun 2011.

KAWANO Y, NAGATA M, KOHNO T, ICHIMIYA A, IWAKIRI T, OKUMURA M, ARIMORI K. Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. **Biol Pharm Bull.**; n. 35, v.3, p. 400-7, 2012.

KERSHENOBICH, D. et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. **Liver Int**, v. 31 Suppl 2, p. 18-29, Jul 2011.

KIM, A. I.; SAAB, S. Treatment of Hepatits C. **Am J Med**, v.118, n.8, p. 808-15, 2005.

KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods Mol Biol**, v. 510, p. 33-53, 2009.

LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 107-15, Feb 2011.

LEE, J. C. et al. Anti-hepatitis C virus activity of Acacia confusa extract via suppressing cyclooxygenase-2. **Antiviral Res**, v. 89, n. 1, p. 35-42, Jan 2011.

LIN, Y. T. et al. Green tea phenolic epicatechins inhibit hepatitis C virus replication via cyclooxygenase-2 and attenuate virus-induced inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54466, 2013.

LINDENBACH, B. D. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 623-6, Jul 22 2005.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933-8, Aug 18 2005.

LOHMANN, V. et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**, v. 285, n. 5424, p. 110-3, Jul 2 1999.

MACDONALD, A.; CROWDER, K.; STREET, A.; MCCORMICK, C.; HARRIS, M. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. **Journal of General Virology**, v. 85, p.721-729, 2004.

MACDONALD, A.; HARRIS, M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 9, p. 2485-502, Sep 2004.

MANNS, M. P. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 958-65, Sep 22 2001.

MATSUURA, Y.; MIYAMURA, T. The molecular biology of hepatitis C virus. **Seminars in VIROLOGY**, v.4, p. 297-304, 1993.

MAUSS, BERG, ROCKSTROH, SARRAZIN, WEDEMEYER, et al., **Hepatology: A clinical textbook**. Fifth Edition, 2014.

MODI, A. A. et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 201-9, Jan 2010.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 453-63, Jun 2007.

NAKAGAWA, S. et al. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 4, p. 882-8, Feb 23 2007.

NEGRO, F.; ALBERTI, A. The global health burden of hepatitis C virus infection. **Liver Int**, v. 31 Suppl 2, p. 1-3, Jul 2011.

OKAMOTO, T. et al. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. **EMBO J**, v. 25, n. 20, p. 5015-25, Oct 18 2006.

OKANO, J. et al. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102, n. 6, p. 543-51, Jun 2008.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. **Clin Liver Dis**, v. 7, n. 1, p. 45-66, Feb 2003.

PAWLOTSKY, J. M. Teraphy of hepatitis C: from empiricism to eradication. **Hepatology**, v. 43, p. S207-20, 2006.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5-19, Jan 2004.

RAVIKUMAR, Y. S. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthus amarus* as potent natural source. **Virus Res**, v. 158, n. 1-2, p. 89-97, Jun 2011.

ROTHWANGL, K. B.; RONG, L. Analysis of a conserved RGE/RGD motif in HCV E2 in mediating entry. **Viol J**, v. 6, p. 12, 2009.

RUHL, C.E. EVERHART, J.E. Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver disease in the United States. **Gastroenterology**; v.129, p.1928 1936, 2005.

SCHREGEL, V. et al. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5342-7, Mar 31 2009.

SIMISTER, P. et al. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. **J Virol**, v. 83, n. 22, p. 11926-39, Nov 2009.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 11, p. 3173-88, Nov 2004.

STEINMANN, E.; PENIN, F.; KALLIS, S.; PATEL, A.H.; BARTENSCHLAGER, R.; PIETSCHMANN, T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS Pathog**, v.3 p.e103, 2007.

SUMPTER, R., JR. et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. **J Virol**, v. 79, n. 5, p. 2689-99, Mar 2005.

SUZUKI, R. et al. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 1271-81, Jan 2005.

TANG, H.; GRISE, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 2, p. 49-65, Jul 2009.

TAO, Z. et al. Quantitative measure of cytotoxicity of anticancer drugs and other agents. **Anal Biochem**, v. 381, n. 1, p. 43-52, Oct 1 2008.

THIMME, R.; BINDER, M.; BARTENSCHLAGER, R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 663-83, May 2012.

THOMAS, E. et al. Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. **Hepatology**, v. 53, n. 1, p. 32-41, Jan 2011.

TSCHERNE, D. M. et al. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. **J Virol**, v. 80, n. 4, p. 1734-41, Feb 2006.

TZIVELEKA, L.A; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. **Curr Top Med Chem**, v. 3, p. 1512-35, 2003

VIEYRES, G.; DUBUISSON, J.; PIETSCHMANN, T. Incorporation of hepatitis C virus e1 and e2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1149-87, 2014.

WAKAI, K. et al. Liver cancer risk, coffee, and hepatitis C virus infection: a nested case-control study in Japan. **Br J Cancer**, v. 97, n. 3, p. 426-8, Aug 6 2007.

WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med**, v. 11, n. 7, p. 791-6, Jul 2005.

WEINER, A. J. et al. Sequence variation in hepatitis C viral isolates. **J Hepatol**, v. 13 Suppl 4, p. S6-14, 1991.

WHO, world Health Organization, 2013.

Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>> Acesso em 13/03/14

WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W. P.; SARRAZIN, C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 23-38, Jan 2007.

WOZNIAK, A. L. et al. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 9, p. e1001087, 2010.

WYLES, D. L. et al. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2660-2, Jun 2009.

YI, Z. et al. Hepatitis C virus co-opts Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1 for its genome replication. **J Virol**, v. 85, n. 14, p. 6996-7004, Jul 2011.

ZEITLIN, R. et al. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. **Brain Res**, v. 1417, p. 127-36, Oct 12 2011.

ZHONG, J. et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9294-9, Jun 28 2005.

Capítulo II

1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Caffeine inhibits Hepatitis C virus replication *in vitro*

Mariana N. Batista^a, Bruno M. Carneiro^a, Ana Cláudia S. Braga^a, Paula Rahal^{a*}

^aDepartment of Biology, Institute of Bioscience, Language & Literature and Exact Science, São Paulo State University, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

* Corresponding author at: Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil. Tel.: +55 17 32212390; fax: +55 17 32212390. **E-mail address:**prahal@ibilce.unesp.br; brunocopo@yahoo.com.br

Abstract

Hepatitis C is considered the major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Conventional treatment is not effective against some hepatitis C virus (HCV) genotypes; therefore, new treatments are needed. Coffee and more recently, caffeine, have been found to have a beneficial effect in several disorders of the liver, including those manifesting abnormal liver biochemistry, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Caffeine acts directly by delaying fibrosis, thereby improving the function of liver cellular pathways and interfering with pathways used by the HCV replication cycle. In the current study, the direct relationship between caffeine and viral replication was evaluated. The Huh-7.5 cell line was used for transient infections with FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi and to establish a cell line stably expressing SGR-Feo JFH-1. Caffeine efficiently inhibited HCV replication in a dose-dependent manner at non-cytotoxic concentrations and demonstrated an IC₅₀ value of 0.7263 mM after 48 h of incubation. These data demonstrate that caffeine may be an important new agent for anti-HCV therapies due to its efficient inhibition of HCV replication at non-toxic concentrations.

Keywords:

HCV; caffeine; replication; Huh-7.5 cells

Introduction

Hepatitis C is a liver infection caused by hepatitis C virus (HCV) [5]. Usually, infection does not generate an adequate host immune response [13] and it progresses to a chronic infection in approximately 80 % of patients [18]. HCV infection is a global public health problem and has been associated with 350,000 annual deaths related to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [4]. Pegylated interferon alpha (PEG-INF) in association with ribavirin (RBV) has been the standard treatment for patients with chronic HCV infection in last decade [35]. The new standard treatment includes the protease inhibitors, boceprevir and telaprevir, in association with PEG-IFN and RBV [28]. However, severe side effects are observed, the treatment is costly and viral resistance has been demonstrated for all classes of directly acting antivirals [17]. Therefore, new treatments are needed.

Coffee and caffeine consumption has been associated with beneficial effects in patients with abnormal liver function, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3, 6, 10]. The daily consumption of approximately 3 cups of coffee [10], which is approximately 408 mg of caffeine [6], may reduce the risk of chronic liver disease progression. Caffeine has also been demonstrated to have an antiproliferative effect on liver cancer cells [27]. Moreover, caffeine consumption may limit liver fibrosis, especially in patients with chronic HCV infection (14 % milder than other fibrosis groups) [23].

It has been suggested that caffeine may interact with cellular pathways to slow the progression of liver diseases. Among these pathways, a decrease in alanine aminotransferase (ALT) [30], alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase (ASP) and an increase in serum albumin have been observed [23]. These studies indicate that caffeine has the potential to improve liver functions in patients chronically infected with HCV. As there is no evidence of a direct interference of caffeine on the HCV replication cycle, the aim of the current study was to assess the effect of caffeine on HCV replication.

Materials and Methods

HCV Replicons

The replicons used in the study were as follows: FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi, a monocistronic full-length HCV genome that expresses Renilla luciferase (Rluc) [33], derived from the previously described infectious genotype 2a of the HCV genome, J6/JFH1 [21]; and SGR-Feo JFH-1, a bicistronic subgenomic replicon based on the JFH-1 sequence that possesses the firefly luciferase gene fused to a neomycin resistance gene [37]. RNA was transcribed from the plasmids (pFL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi J6-JFH1 RLUC and pSGR-Feo JFH-1) after linearization with the XbaI enzyme and Mung bean treatment followed by phenol/chloroform extraction [43]. The purified product was used as a template for transcription with the T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega, Madison – WI, USA).

Cell Culture

The human hepatoma cell line (Huh-7.5) was maintained in DMEM medium supplemented with 10 % FBS (Cutilab, Campinas – SP, BR), 1 % (v/v) non-essential amino acids (Gibco – Life Technologies, USA), 100 U/mL penicillin (Gibco – Life Technologies, USA), 100 mg/mL streptomycin (Gibco – Life Technologies, USA) and 1 % HEPES (Gibco – Life Technologies, USA) in a humidified 5 % CO₂ incubator. The Huh-7.5 cell line stably expressing SGR-Feo JFH-1 was maintained in DMEM supplemented with 500 µg/mL G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA).

HCV RNA Transfection

Cells were transfected with transcribed HCV RNA by electroporation as described elsewhere [1]. Briefly, cells were detached by trypsin treatment and washed twice with RNase-free PBS and then resuspended in 10 mL of Cytomix buffer [34]. Ten micrograms of FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi RLUC RNA or SGR-Feo JFH-1 RNA was mixed with 4×10^6 (subgenomic assay) or 8×10^6 (HCVcc assay) cells in a 4-mm cuvette, and a Bio-Rad Pulser Xcell system (Bio-Rad, Amadora, PT) was used to deliver a single pulse at 0.27 kV, 950 µF and ∞ ohms. Electroporated cells were transferred to culture flasks containing complete DMEM. The stable cell line harboring SGR-Feo JFH-1 RNA was

obtained after G418 selection of electroporated cells (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA) after at least three weeks of culture.

Caffeine Cytotoxicity Profile

The cytotoxicity of caffeine (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA) was determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA). Cytotoxicity was assessed after the cells were incubated for 24 h, 48 h and 72 h with caffeine.

Cell cycle analysis by flow cytometry

Prior to start this assay, cells were synchronized in G0 by FBS deprivation for 24 h. To determine cell cycle pattern of caffeine-treated cells, synchronized Huh-7.5 cells stably expressing SGR-Feo JFH-1 were seeded on a 96-well plate (5×10^3 cells/well) 24 h before treatment. Caffeine was then added at the following concentrations: 0; 0.250 mM; 0.5 mM; 1 mM; 2 mM and 4 mM. One set of cells was maintained without serum to serve as positive control of cell cycle arrest in G0. Forty eight hours post-treatment, cells were resuspended, counted and fixed overnight with cold ethanol 75 %. On the following day, cells were stained with Guava Cell Cycle Reagent following the manufacturer's instructions (EMD Millipore Corporation, Hayward, CA - EUA). Subsequently, cells were analyzed using easyCyte 5HT flow cytometry (Guava Easycheck, Millipore Corporation, Hayward, CA - EUA) with 10,000 events acquired from each sample.

Apoptosis fluorescence staining

To evaluate the influence of caffeine on programmed cell death, Huh-7.5 cells stably expressing SGR-Feo JFH-1 were seeded on a 96-well plate (5×10^3 cells/well) 24 h before treatment. Caffeine was then added at the following concentrations: 0; 0.250 mM; 0.5 mM; 1 mM; 2 mM and 4 mM and Curcumin (50 μ M) was used as positive control of apoptosis [36]. Twenty four hours or 48 h post treatment, cells were fixed with Karnovsky solution (1 paraformaldehyde: 1 glutaraldehyde 4 %) for 1 h and then stained with Acridine orange 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA) for 10 minutes. Subsequently, the cells were washed three times with PBS and observed on Fluorescence

microscope (Zeiss Axio Vert A1). All cells from 20 different fields were counted and cell count was compared with negative control (zero caffeine).

Autophagy fluorescence staining

To analyze caffeine influence on nonapoptotic programmed cell death, Huh-7.5 cells stably expressing SGR-Feo JFH-1 were seeded on 24-well plate (1×10^4 cells/well) 24 h before treatment. Caffeine was then added at the following concentrations: 0; 0.250 mM; 0.5 mM; 1 mM; 2 mM and 4 mM. Curcumin (20 μ M) was used as positive control of autophagy [7, 29]. Forty eight hours post treatment, cells were incubated with Acridine Orange (500 μ g/mL) for 15 minutes. The analysis was performed during 45 minutes after acridine addition to avoid acridine-induced cell death. All cells from 20 different fields were counted and cell count was compared with negative control (no caffeine).

Indirect Immunofluorescence assay

Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and permeabilized with 0.1 % triton-X-100. The cells were then incubated with a primary polyclonal sheep antibody against NS5A protein (kindly provided by Professor Mark Harris, University of Leeds) at a dilution of 1:4,000 followed by incubation with a 1:500 dilution of an Alexa Fluor® 594-conjugated donkey anti-sheep IgG (H+L) (Life Technologies, Carlsbad – CA, USA) both for 2 h at room temperature.

Virus Titration

Cell supernatants were serially diluted 10-fold in complete DMEM and used to infect 5×10^3 Huh-7.5 cells per well in 96-well plates. The inoculum was incubated with the cells for 48 h at 37°C and then fixed with 4 % paraformaldehyde. HCV infection was determined by immunofluorescent staining for the HCV NS5A. The viral titer was expressed as focus-forming units per milliliter of supernatant (FFU/mL), determined by calculating the average number of NS5A-positive foci present at the highest dilutions.

Luciferase reporter assay

To determine the IC₅₀ value of caffeine against the virus, HCV subgenomic replicon protein expression in Huh-7.5 cell line was analyzed during caffeine treatment. Huh-7.5 cells stably expressing SGR-Feo JFH-1 were seeded on a

96-well plate (5×10^3 cells/well) 24 h before treatment. Caffeine was then added at the following concentrations: 10 mM; 3.17 mM; 1 mM; 0.317 mM; 0.1 mM; 0.0317 mM; 0.01 mM; 0.00317 mM; 0.001 mM; 0.000317 mM. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ for 48 h. Cyclosporine A (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA) was used as a positive control for inhibition, and milli-Q water (diluent of caffeine solutions) was used as a negative control for inhibition. After treatment, the cells were disrupted with 30 µL of passive lysis buffer (Promega, Madison - WI, USA) and exposed to a luciferase substrate (Promega, Madison - WI, USA). Luciferase activity was measured using a luminometer (FLUOstar Omega/BMG Labtech, Offenberg - BWL, DE), and a BCATM protein assay kit (Thermo-Scientific, Rockford - IL, USA) was used to normalize protein concentrations.

Protein expression analysis

To analyze HCV protein expression upon caffeine or cyclosporine treatment, a western blot was performed. In this assay, Huh-7.5 cells containing SGR-Feo JFH-1 or infected with FL-J6/JFH-5'C19Rluc2Aubi were seeded at 2×10^5 cells/well on a 6-well plate. Cells were treated with the appropriate drug concentrations, and after 48 h, the cells were lysed with the CellLyticTM M (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA). The protein in the cell lysate was then quantified using the BCA assay (Thermo-Scientific-Pierce, Rockford - IL, USA) following the manufacturer's instructions. Subsequently, the proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane (Millipore, Bedford – MA, USA), blocked in TBS-T with 5 % skim milk (Bio-RAD, Amadora - PT) and incubated overnight with a polyclonal anti-NS3 mouse antibody (1:3,000) (Abcam, San Francisco – CA, USA). The membrane was then incubated with anti-mouse IgG (whole molecule) (Abcam, San Francisco – CA, USA). The membrane was incubated for 1 minute with the Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo-Scientific-Pierce, Rockford - IL, USA), and luminescence intensity was captured on a Chemi-Doc System (Bio-RAD, Amadora - PT). GAPDH (Abcam, San Francisco – CA, USA) was used as the endogenous control for normalization of protein expression.

Statistical methods

The half-maximal inhibitory concentration of caffeine (IC₅₀) was calculated using a linear regression. The results of the inhibition of SGR-Feo JFH-1 were calculated as the percentage of the negative control (medium, no drug). All statistical analyses were performed by one-way ANOVA with Tukey's post test using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego - CA, USA).

Results

MTT

Caffeine cytotoxicity against Huh-7.5 cells containing SGR-Feo JFH-1 was determined by MTT assay. The solubility of caffeine in water is 16 mg/mL at room temperature, and we used this point of reference to test different concentrations in cell culture. We observed that cell viability was affected by caffeine in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1a). When the cells were treated with caffeine concentrations above 2 mM for 48 h, the cell viability was close to 80 %. After 72 h of treatment, the cells reached this arbitrary cell viability cutoff at concentrations below 1 mM. Thus, we observed maximum viral inhibition at safe concentrations after 48 h; this time point was therefore selected for all subsequent experiments. Caffeine concentrations equal to or below 1 mM were safely tolerated by the cells, but a 2-fold increase (2 mM) reduced cell viability to approximately 80 % after 48 h. Therefore, 2 mM was the highest concentration utilized for further experiments.

Inhibitory effect of Caffeine on HCV replication

To evaluate the effect of caffeine on HCV replication, SGR-Feo JFH-1 cells were incubated with the following concentrations of caffeine: 0.5 mM, 1 mM and 2 mM. Replication efficiency was measured 48 h after treatment using luciferase assays. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of caffeine was determined to be approximately 0.726 mM (Fig. 1b). When the cells were treated with 0.5 mM caffeine, viral replication was inhibited by 33.56 ± 7 % (n=9) compared with the mock control. An increase in the drug concentration showed an increase in the inhibition of viral replication in a dose-dependent manner (Fig. 2a). The highest safely tolerated concentration (2 mM) of caffeine reduced

the luciferase activity by 82 ± 2 % (n=9) of the mock control values. Protein expression levels were also verified by western blot analysis of the NS3 virus protein (Fig. 2b). After 48 h of treatment, caffeine reduced viral protein expression by at least 70 % at the highest drug concentration.

HCVcc inhibition by caffeine

To verify whether caffeine could also interfere with full-length HCV replication, Huh-7.5 cells were infected with cell-culture derived HCV (HCVcc) at a multiplicity of infection of 0.1 and treated with different concentrations of caffeine. Similar to what was observed in the stable cell line, caffeine reduced viral replication in a dose-dependent manner (Fig. 2c). Using the drug at 2 mM, the intracellular levels of luciferase were reduced by 79.3 ± 9 % of the mock control, whereas at 0.5 mM, luciferase levels were reduced by 40.6 ± 13 % of the mock control. Analysis of the NS3 virus protein by western blot showed that after 48 h of treatment, viral protein expression was reduced by at least 60 % at the highest drug concentration (Fig. 2d).

Physiologic state analysis

To evaluate the influence of caffeine on the cell cycle, caffeine-treated cells were submitted to cell cycle assay by flow cytometry. We observed that both cells treated with or without caffeine kept the in division process, ranging between S or G2/M phases. The highest concentration used in inhibition assays (2 mM) presented 74,15 % of cells in division (S or G2/M) and caffeine free cells (negative control) presented 78 % of cells in division, thus there was no statistical significant differences among frequency of cell division. Cells maintained without serum were used as positive control of cell cycle arrest, and presented 52.45 % cell cycle arrest in G0/G1 while negative control presented 22 % of cells at this stage (Fig. 3).

After cell cycle analysis we tested caffeine capacity in induction of cell apoptosis. The changes in cell morphology were evaluated using acridine orange fluorescence staining. The assay was performed 24 h (Supplementary Material, S2) and 48 h post-caffeine treatment on Huh7.5/ SGR-Feo JFH-1 cells at concentrations: 0.250 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 4 mM. The cells were classified as apoptotic when presented extensive plasma membrane blebbing or apoptotic bodies [9]. The occurrence of cell shrinkage concomitant with

apoptotic bodies was also considered as apoptosis. The percentage of apoptotic cells in the overall population upon caffeine treatment showed no significant increase of apoptosis related to negative control (zero caffeine). At Caffeine concentration of 2 mM, it was observed 9.91 % (relative to total analyzed cells) of apoptotic cells, while negative control presented 6.82 % of apoptosis (no statistical significant differences among groups were observed). Curcumin-treated cells (50 μ M) were used as positive control of apoptosis and presented 62.2 % of apoptotic cells while negative control presented 6.82 % of total cells (Fig. 4).

Autophagy fluorescence staining

Aiming to clarify caffeine-induced cell death, the mechanism of autophagy was evaluated on different caffeine concentrations used to virus inhibition tests. Cells were considered in autophagy process when presented red corpuscles indicative of acid compartments [38] as mature autophagosomes or autophagolysosomes. The percentage of autophagic cells in the overall population in caffeine treatments showed no significant increase of autophagy related to negative control (zero caffeine). At Caffeine concentration of 2 mM, it was observed 69.7 % of autophagic cells; while negative control presented 51.8 % of autophagy (no statistical significant differences among groups were observed). Curcumin-treated cells (20 μ M) were used as positive control of autophagy and presented 68.7 % of apoptotic cells while negative control presented 51.8 % of total cells (Fig. 5).

Discussion

In this study, we clearly demonstrated that caffeine, a phytochemical found in many plants, is able to reduce HCV replication. This effect was observed using the 2a genotype in Huh-7.5 cells. Caffeine treatment resulted in dose-dependent inhibition and reduced viral replication by up to 80 % of the mock control when tested at 2 mM (the highest non-cytotoxic concentration for this cell line). Cell viability values could be increased if caffeine could be tested on non-cancer cell lines, as primary human hepatocytes (PHH), because caffeine also presents capacity to inhibit liver cancer cells proliferation and induce its death [16, 22]. To our knowledge, this is the first work to demonstrate

the relationship between the *in vitro* administration of caffeine and the decrease in HCV replication. However, clinical data have shown no change in HCV RNA levels in the serum of infected patients [23]. This may be explained by the fact that the caffeine concentration tested in our study was much higher than that found in normal coffee consumption.

To demonstrate that caffeine effect is directly related to drug capacity of inhibiting virus replication, without interference on regular cell conditions, some physiologic evaluations were conducted. This study demonstrated that cell cycle pattern in caffeine-treated cells was maintained unchanged in concentrations used to virus inhibition (caffeine 0.5 mM, 1 mM and 2 mM) in relation to the control. Apoptosis assays, showed maintenance of apoptosis very close to negative control (caffeine zero) when treated with same concentrations of caffeine. Some studies observed changes in these physiological parameters. When Huh-7.5 cells were treated with caffeine at concentrations above 2.5 mM and with incubation for longer periods (72 h), cells presented a tendency to cell arrest in G0/G1 phase [27]. In other cases, caffeine induced directly [22] or indirectly [16] an increase of apoptosis. However, we did not observe these conditions in this study.

We observed that treatment with caffeine increased the proportion of cells in autophagic state (no statistical significance). It has already been described by other authors that caffeine can induce this state in liver cells [31]. Our results have shown a high autophagy rate even on negative control (no caffeine). This can be explained by the diversity of autophagy processes induced in hepatocytes. Furthermore, autophagy appears at high frequency in cancer cells, serving as tumor-suppressor mechanism or used to tumor cells survival [40]. Moreover, Huh-7.5 cell line stably expressing SGR-Feo JFH-1, can be affected by autophagy process induced by HCV infection [8]. Autophagy was first described as a mechanism of cellular maintenance and survival as a response to stressful stimulus, in our case, treatment with caffeine. However, in some situations, autophagy may be responsible for cells destruction as a result of protracted atrophy of the cytoplasm. In this case, autophagy acts as a non-apoptotic programmed cell death [7]. In this study it was not determined whether this process led to cell death, but it is possible that the observed result may explain the observed reduction of viability shown in the MTT assay. Moreover,

an increased rate of autophagy has been correlated with an improvement in HCV replication [8, 24]. We believe that caffeine-induced increase of autophagy did not improve HCV replication because autophagy proteins are required only for initial steps of HCV replication but not once replication is established. Therefore we believe that increased autophagy rate does not impair replication of the virus and the caffeine has indeed an effect on this virus replication.

Viral replication is an essential step in the maintenance of infection, and the process represents an important target of antiviral therapy. Most new HCV therapies are based on inhibiting viral replication [12]. However, these therapies are restricted to the inhibition of HCV replication, but in addition to its effect on viral replication, caffeine can also reduce the liver damage caused by chronic HCV infection. Caffeine can act on detoxification pathways [32] and enhance the expression of liver enzymes, such as ALT, ASP, alkaline phosphatase and albumin [6, 10, 23]. Moreover, it has already been reported that caffeine may alter cancer cell proliferation by inducing cell cycle arrest [27] and cellular apoptosis [22] and by inhibiting pro-inflammatory gene expression [14].

Although the caffeine-mediated inhibition of HCV replication was clearly demonstrated in this study, the inhibitory mechanism remains unknown. Caffeine reduces the expression of proteins in cell pathways used by HCV replication, including the following: HSP90, which interacts directly with NS5A [2, 25, 26]; Ras-ERK, which interacts directly with NS5B and the 5' end of the negative RNA strand of HCV [27, 39, 41]; and COX-2 [14, 15]. However, there is not much evidence supporting these candidate pathways.

The cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme is strongly associated with HCV replication, and many studies have shown an interaction [11, 19, 20]. For example, COX-2 can increase virus expression and can recover HCV replication capacity after HCV inhibition by catechins from green tea [20]. Kang et al. (2012) demonstrated the ability of caffeine to inhibit COX-2 in microglial cells. Caffeine may also inhibit some ERK pathway proteins that are responsible for regulating COX-2 expression [14, 27]. Therefore, we hypothesize that caffeine may regulate HCV replication by altering COX-2 expression in treated cells, although more studies are needed to confirm this hypothesis. Nevertheless, COX-2 is a good candidate that may be involved in the inhibitory

effect of caffeine on HCV; however, we cannot rule out the possibility that caffeine may interact directly with a viral protein.

Conclusion

The data presented in this study indicates that pure caffeine significantly inhibited genotype 2a HCV replication *in vitro*. However, a definitive mechanism of the inhibitory effect of caffeine was not established. Further studies on the cell pathways and viral proteins expressed upon caffeine exposure as well as an efficient *in vivo* caffeine delivery method are needed.

Acknowledgments

The authors are grateful to Professor Mark Harris (University of Leeds, UK) for providing the polyclonal anti-NS5A antibody and to CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) and FAPESP (grant 2012/19074-1 São Paulo Research Foundation) for financial support. The authors would also like to thank all members of the Laboratory of Genomics Studies (IBILCE-UNESP, BR) for their helpful suggestions and discussions.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Amako Y, Syed GH, Siddiqui A (2011) Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein. *The Journal of biological chemistry* 286:11265-11274
2. Beran RK, Sharma R, Corsa AC, Tian Y, Golde J, Lundgaard G, Delaney WEt, Zhong W, Greenstein AE (2012) Cellular growth kinetics distinguish a cyclophilin inhibitor from an HSP90 inhibitor as a selective inhibitor of hepatitis C virus. *PloS one* 7:e30286
3. Cadden IS, Partovi N, Yoshida EM (2007) Review article: possible beneficial effects of coffee on liver disease and function. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 26:1-8
4. Chevaliez S, Pawlotsky JM (2007) Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World journal of gastroenterology* : WJG 13:2461-2466

5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362
6. Costentin CE, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES, Medkour F, Pawlotsky JM, Mallat A, Hezode C (2011) Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 54:1123-1129
7. Ding Q, Bao J, Zhao W, Hu Y, Lu J, Chen X (2014) Natural autophagy regulators in cancer therapy: a review. *Phytochemistry Reviews*
8. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV (2009) The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:14046-14051
9. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35:495-516
10. Freedman ND, Everhart JE, Lindsay KL, Ghany MG, Curto TM, Shiffman ML, Lee WM, Lok AS, Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Hoefs JC, Dienstag JL, Morishima C, Abnet CC, Sinha R, Group H-CT (2009) Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 50:1360-1369
11. Gretton S, Hughes M, Harris M (2010) Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signalling. *The Journal of general virology* 91:671-680
12. Halfon P, Locarnini S (2011) Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *Journal of hepatology* 55:192-206
13. Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:S21-29
14. Kang CH, Jayasooriya RG, Dilshara MG, Choi YH, Jeong YK, Kim ND, Kim GY (2012) Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-kappaB activation and ERK phosphorylation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50:4270-4276
15. Kang NJ, Lee KW, Kim BH, Bode AM, Lee HJ, Heo YS, Boardman L, Limburg P, Lee HJ, Dong Z (2011) Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis* 32:921-928
16. Kawano Y, Nagata M, Kohno T, Ichimiya A, Iwakiri T, Okumura M, Arimori K (2012) Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in

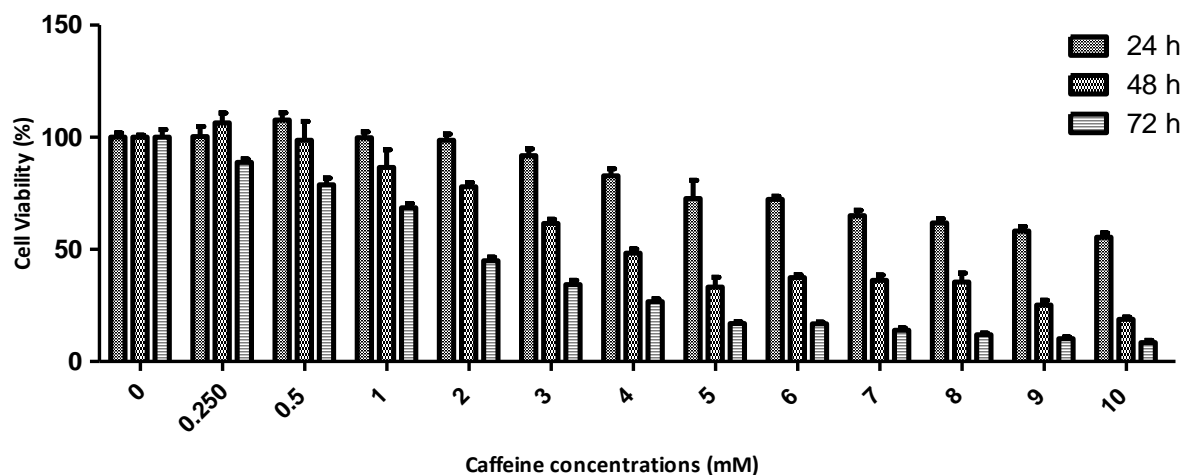
- human hepatocellular carcinoma cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 35:400-407
17. Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR (2010) Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65:202-212
 18. Lavanchy D (2011) Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17:107-115
 19. Lee JC, Chen WC, Wu SF, Tseng CK, Chiou CY, Chang FR, Hsu SH, Wu YC (2011) Anti-hepatitis C virus activity of *Acacia confusa* extract via suppressing cyclooxygenase-2. *Antiviral research* 89:35-42
 20. Lin YT, Wu YH, Tseng CK, Lin CK, Chen WC, Hsu YC, Lee JC (2013) Green tea phenolic epicatechins inhibit hepatitis C virus replication via cyclooxygenase-2 and attenuate virus-induced inflammation. *PloS one* 8:e54466
 21. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626
 22. Lu PZ, Lai CY, Chan WH (2008) Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *International journal of molecular sciences* 9:698-718
 23. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH (2010) Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 51:201-209
 24. Mohl BP, Tedbury PR, Griffin S, Harris M (2012) Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response. *Journal of virology* 86:10724-10732
 25. Nakagawa S, Umehara T, Matsuda C, Kuge S, Sudoh M, Kohara M (2007) Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochemical and biophysical research communications* 353:882-888
 26. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y (2006) Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *The EMBO journal* 25:5015-5025
 27. Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y (2008) Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 102:543-551

28. Pawlotsky JM (2012) New antiviral agents for hepatitis C. *F1000 biology reports* 4:5
29. Qian H, Yang Y, Wang X (2011) Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 43:125-131
30. Ruhl CE, Everhart JE (2005) Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 128:24-32
31. Sinha RA, Farah BL, Singh BK, Siddique MM, Li Y, Wu Y, Ilkayeva OR, Gooding J, Ching J, Zhou J, Martinez L, Xie S, Bay BH, Summers SA, Newgard CB, Yen PM (2014) Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology* 59:1366-1380
32. Tao Z, Jones E, Goodisman J, Soud AK (2008) Quantitative measure of cytotoxicity of anticancer drugs and other agents. *Analytical biochemistry* 381:43-52
33. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology* 80:1734-1741
34. van den Hoff MJ, Moorman AF, Lamers WH (1992) Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic acids research* 20:2902
35. Vermehren J, Sarrazin C (2012) The role of resistance in HCV treatment. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 26:487-503
36. Wang WH, Chiang IT, Ding K, Chung JG, Lin WJ, Lin SS, Hwang JJ (2012) Curcumin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma j5 cells: critical role of ca(+2)-dependent pathway. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2012:512907
37. Wyles DL, Kaihara KA, Korba BE, Schooley RT, Beadle JR, Hostetler KY (2009) The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:2660-2662
38. Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP (2008) Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *American journal of physiology Renal physiology* 294:F777-787

39. Yi Z, Pan T, Wu X, Song W, Wang S, Xu Y, Rice CM, Macdonald MR, Yuan Z (2011) Hepatitis C virus co-opts Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1 for its genome replication. *Journal of virology* 85:6996-7004
40. Yin XM, Ding WX, Gao W (2008) Autophagy in the liver. *Hepatology* 47:1773-1785
41. Zeitlin R, Patel S, Burgess S, Arendash GW, Echeverria V (2011) Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain research* 1417:127-136
42. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9294-9299

FIGURES

A



B

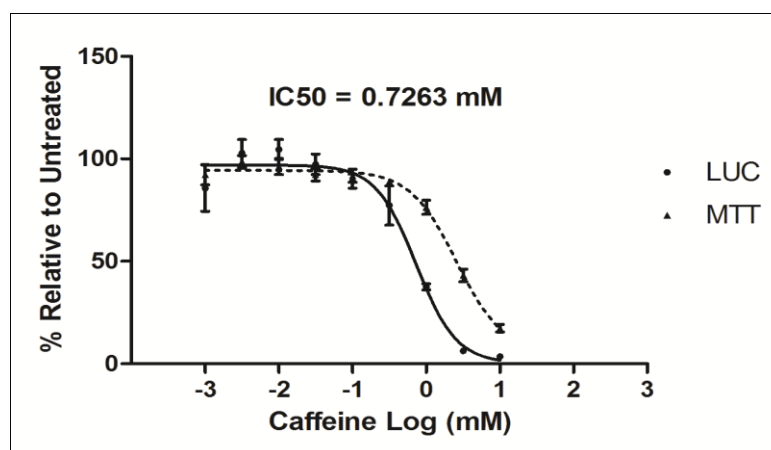


Fig.1 Cell Viability and IC50. a) MTT assay showing the viability of the Huh-7.5 cell line stably expressing SGR-Feo JFH-1 exposed to increasing concentrations of caffeine for 24 h, 48 h and 72 h. Huh-7.5 viability dropped significantly compared with control-treated cells only at caffeine concentrations higher than 1 mM ($P < 0.0001$; $n = 9$). b) Luciferase reporter assay showing the caffeine-induced inhibition of SGR-Feo JFH-1 with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.763 mM; at 48 h post treatment, RLU was normalized to protein content using a BCA assay.

*** $P < 0.0001$ vs. control.

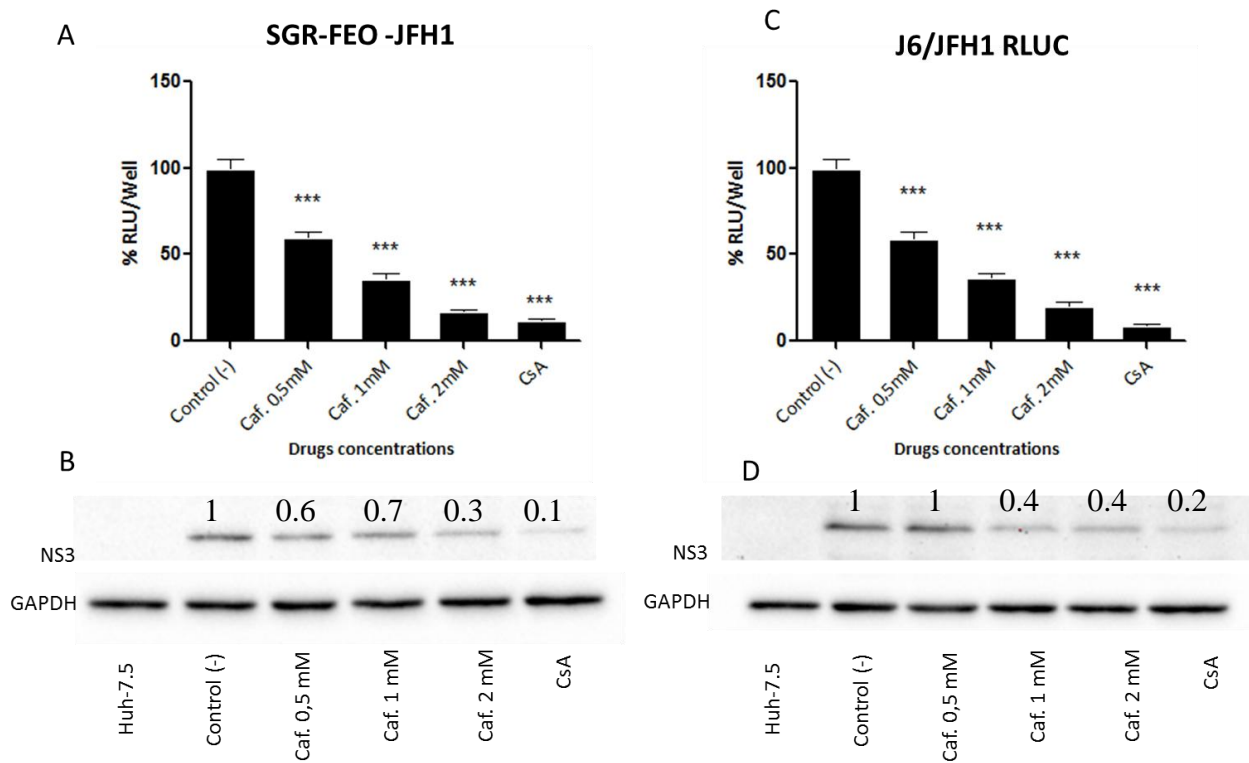


Fig.2 Dose-dependent inhibition of HCV replication by caffeine. a) SGR-Feo JFH-1 RNA inhibition as demonstrated by a luciferase reporter assay. Cells were treated with a range of caffeine concentrations with viability up to 70 % at 48 h. Total protein was extracted, quantified and subjected to luciferase quantitation and BCA protein assessment. Control cells were treated with milli-Q water. Bars represents triplicates of three independent experiments. In these analyses, the difference between caffeine (2 mM) and CsA was not significant. b) SGR-Feo JFH-1 western blot analysis of the NS3 HCV protein. The relative blot intensities were quantified by densitometric analysis with ImageJ software. The densitometry values were normalized to GAPDH, and untreated values were set as 1. c) HCVcc RNA inhibition in the same conditions as SGR-Feo JFH-1 and d) Western blot analysis for HCVcc inhibition in the same conditions as SGR-Feo JFH-1. RLU - Relative Light Units, ***P < 0.0001 vs. control

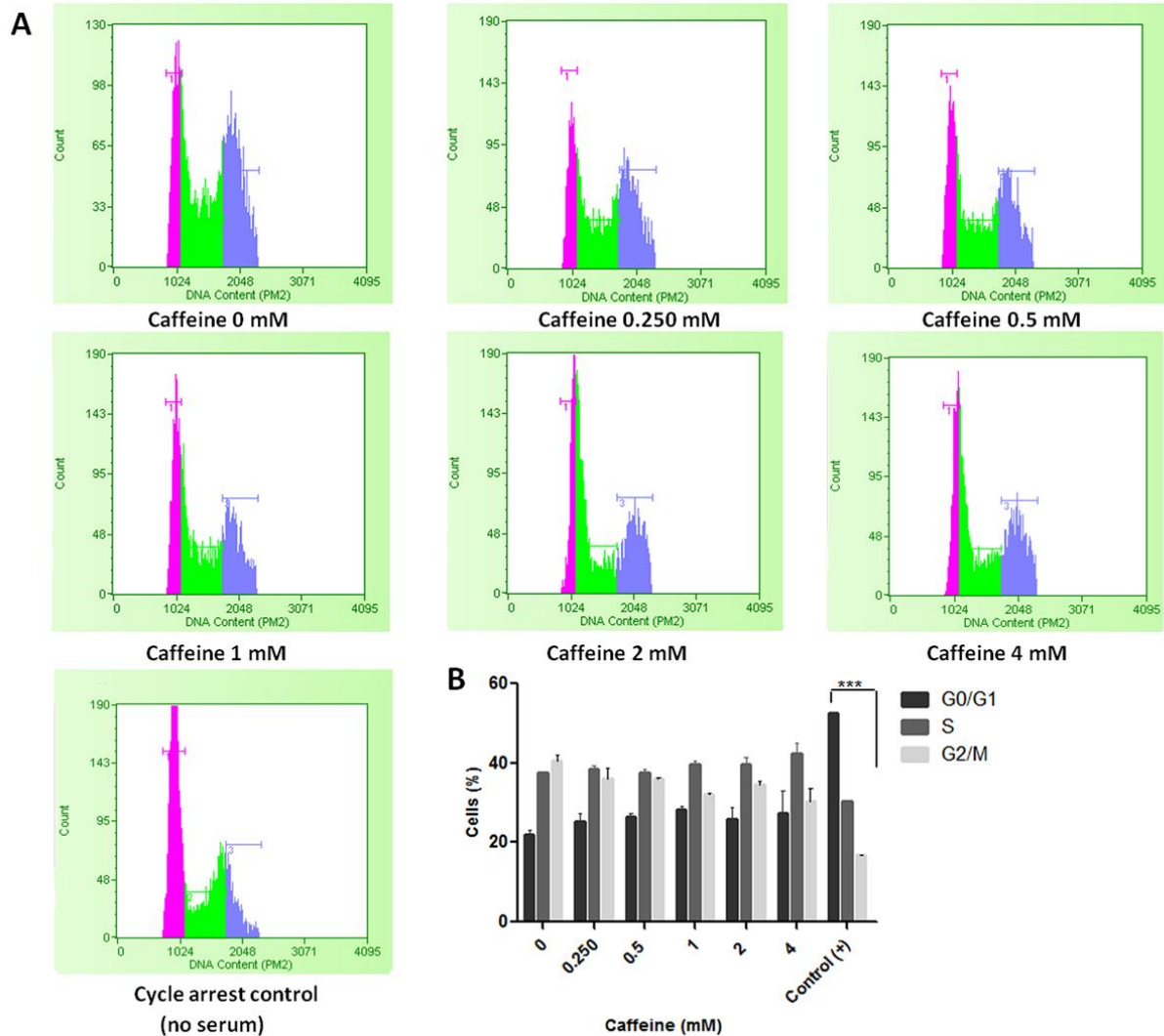


Fig.3 Effects of caffeine on cell cycle pattern of Huh-7.5/ SGR-Feo JFH-1 stable cells. Huh7.5 cells stable harboring SGR-Feo JFH-1 replicon treated with increasing doses of caffeine. Cells were analyzed for their DNA content and the percentage of cells in the different stages of the cell cycle. Cells maintained at serum deprivation were used as cell cycle arrest control. Stable replicon cells treated with caffeine diluent were used as negative control. The assay were performed in two events with 10,000 events ,***P < 0.0001 vs. control. a) Illustrative results showing histograms from cell cycle assay. b) Graphic representation of cell cycle assay.

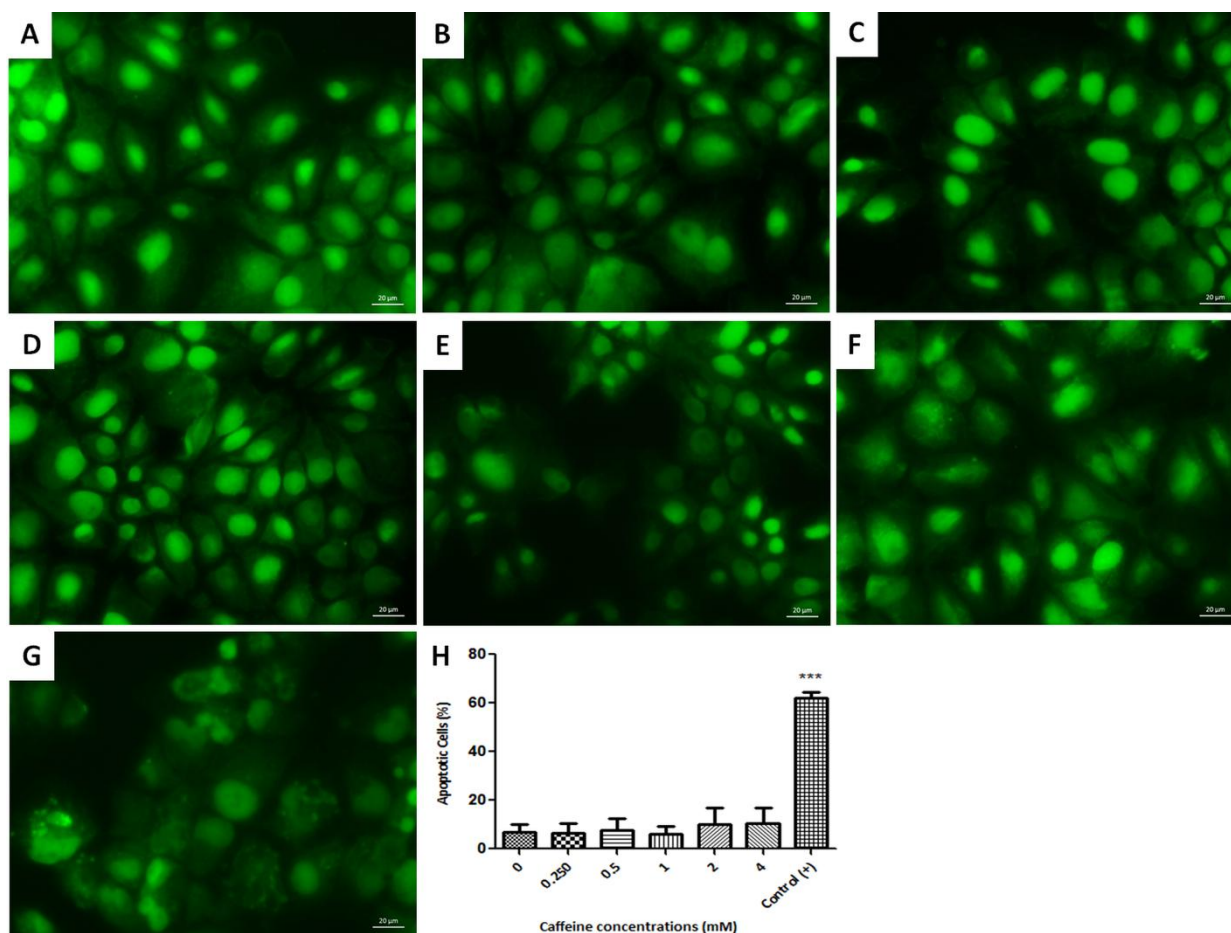


Fig.4 Analysis of morphological changes during treatment of different concentrations of caffeine. After treatment with caffeine at different concentrations for 48 h, Huh7.5/SGR-Feo JFH-1 cells were stained with acridine orange (100 μg/μM) and observed under fluorescence microscopy. a) Stable replicon cells treated with caffeine diluent (negative control). b) Caffeine 0.250 mM. c) Caffeine 0.5 mM. d) Caffeine 1 mM. e) Caffeine 2 mM. f) Caffeine 4 mM. g) Curcumin 50 μM used as positive control of apoptosis. h) Graphic representation of apoptosis results. The assay was performed in two events with 20 fields, ***P < 0.0001 vs. control

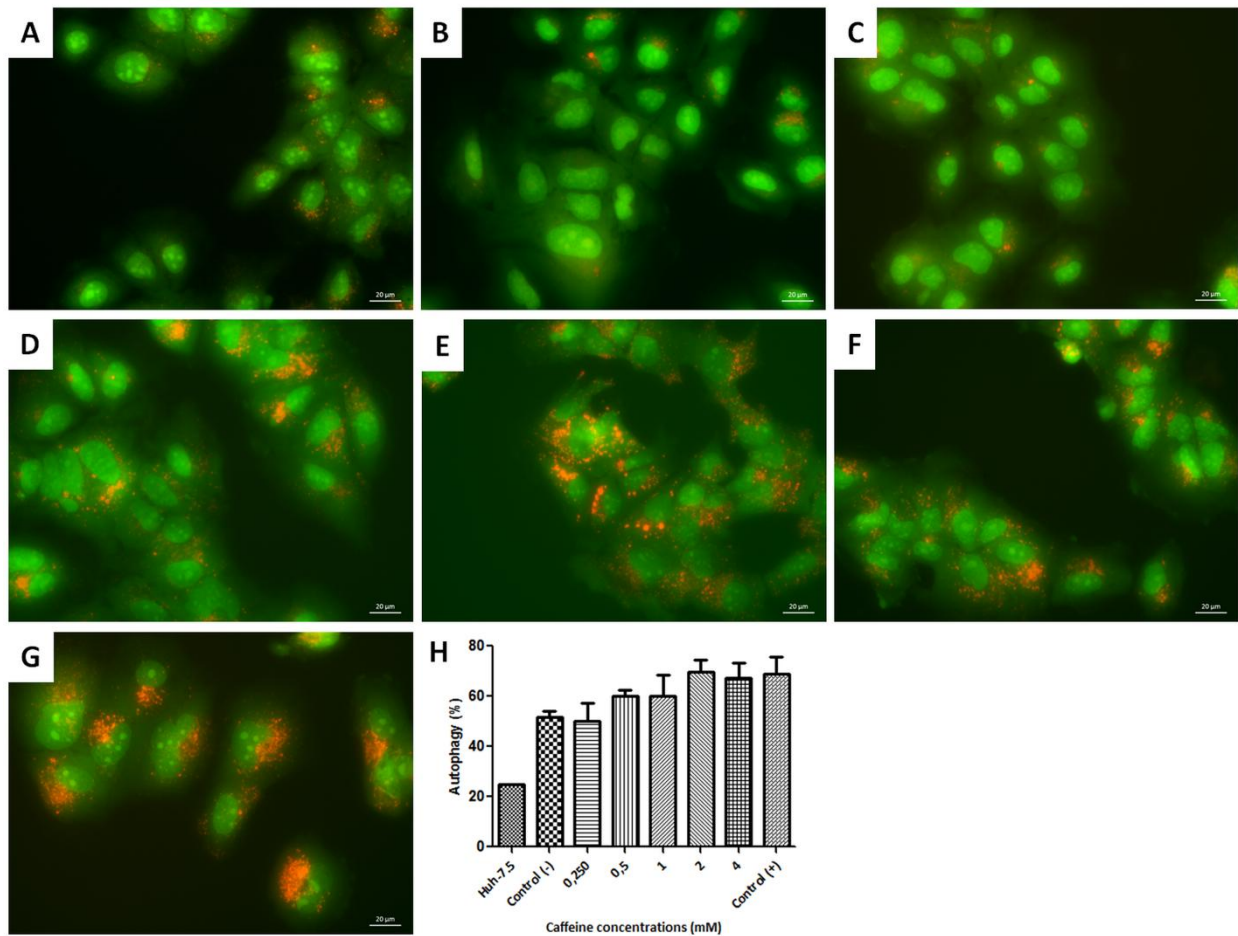


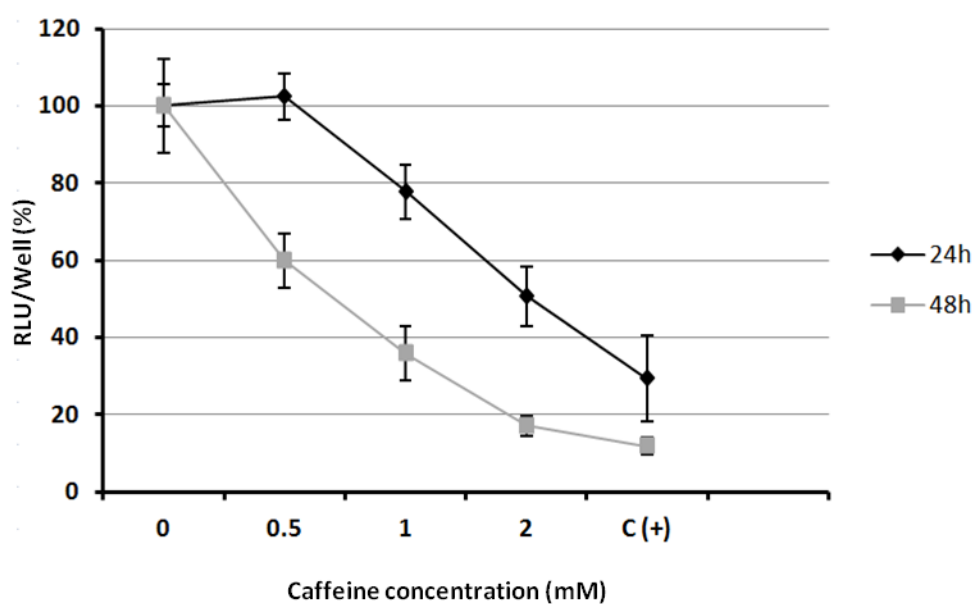
Fig.5 Autophagy occurrence at caffeine-treat cells. After treatment with caffeine at different concentrations for 48 h, Huh7.5/SGR-Feo JFH-1 cells were stained with acridine orange (500 μg/mL) and observed under fluorescence microscopy. a) Stable replicon cells treated with caffeine diluent (negative control). b) Caffeine 0.250 mM. c) Caffeine 0.5 mM. d) Caffeine 1 mM. e) Caffeine 2 mM. f) Caffeine 4 mM. g) Curcumin 20 μM used as positive control of autophagy. h) Graphic representation of autophagy results. The assay was performed in two events with 20 fields.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Results

Inhibitory effect of Caffeine on HCV replication

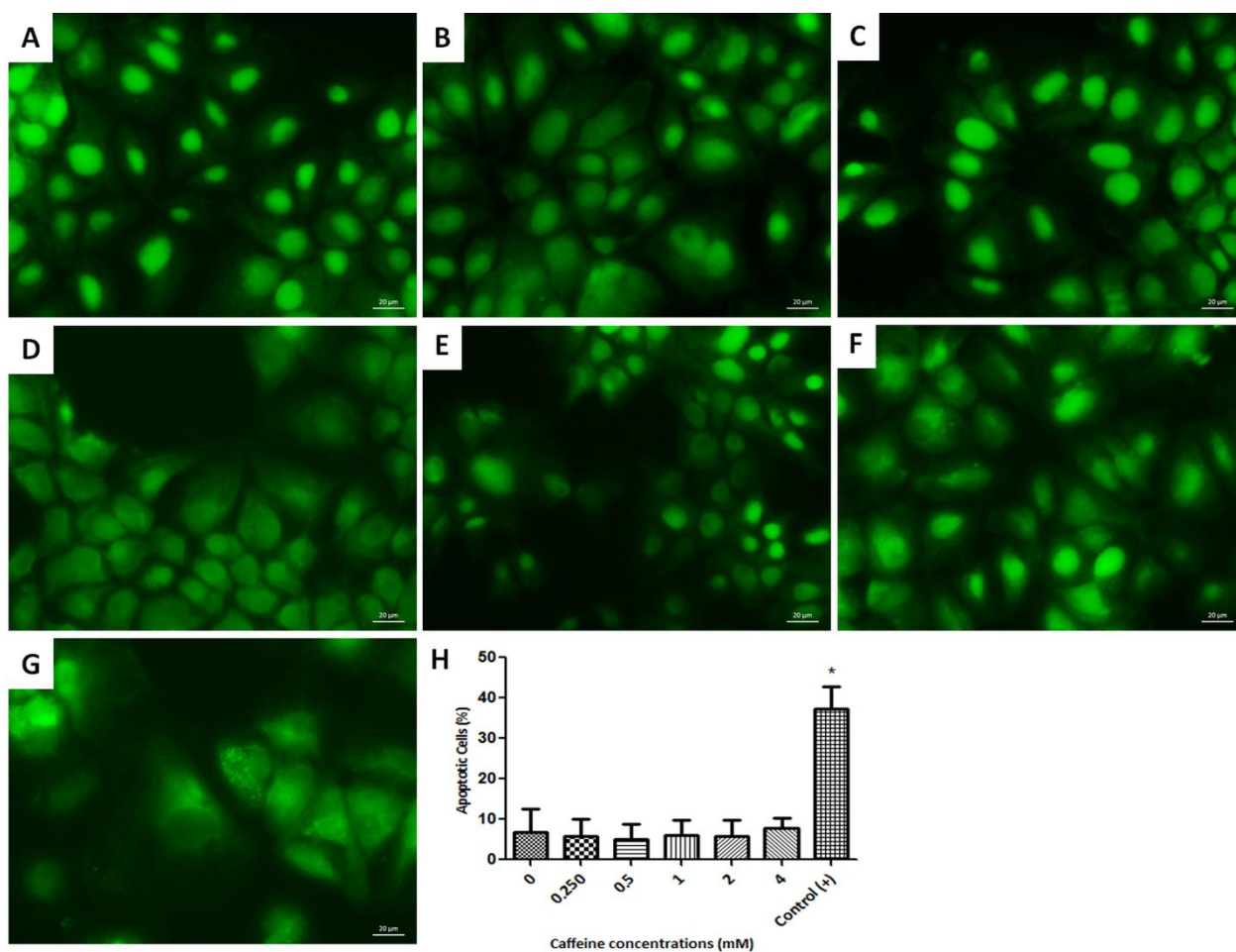
To evaluate the effect of caffeine on HCV replication, SGR-Feo JFH-1 cells were incubated with the following concentrations of caffeine: 0.5 mM, 1 mM and 2 mM. Replication efficiency was measured 24 h after treatment using luciferase assay. When the cells were treated with 1 mM caffeine, viral replication was reduced by $17.5 \pm 4 \%$ (n=9) compared with the mock control. An increase in the drug concentration showed an increase in the inhibition of viral replication in a dose-dependent manner (Fig. S1). The highest safely tolerated concentration of caffeine (2 mM) reduced the luciferase activity by $49.4 \pm 10 \%$ (n=9) of the mock control values.



S1. Dose - dependent inhibition of HCV replication by caffeine 24 h post-treatment. Reduction of SGR-Feo JFH-1 RNA replication as demonstrated by a luciferase reporter assay. Cells were treated with a range of caffeine concentrations with viability up to 100 % for 24 h. Total protein was extracted, quantified and subjected to luciferase quantitation and BCA protein assay. Treatment with Caffeine at 2 mM concentration presented 49.4 % of HCV replication inhibition. Control cells were treated with milli-Q water. Data are presented as three separate experiments performed in triplicate.

Apoptosis fluorescence staining

Changes in cell morphology were evaluated using Acridine Orange fluorescence staining. The assay was performed 24 h post-caffeine treatment on Huh7.5/ SGR-Feo JFH-1 cells at concentrations: 0.250 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 4 mM. The cells were classified as apoptotic when presented extensive plasma membrane blebbing or apoptotic bodies [9]. The occurrence of cell shrinkage concomitant with apoptotic bodies was also considered as apoptosis. The percentage of apoptotic cells in the overall population in caffeine treatments showed no significant increase of apoptosis related to negative control (zero caffeine). Treatment with Caffeine at 2 mM concentration, presented 5.86 % of apoptosis, while negative control (no-caffeine) presented 6.89 % of apoptosis (no significant differences among groups were observed). Curcumin-treated cells (50 μ M) were used as positive control of apoptosis and presented 30 % more apoptosis than negative control (Fig. S2).



S2. Effect of caffeine on Apoptotic features of Huh-7.5/ SGR-Feo JFH-1 stable cells 24 h post-caffeine treatment. After treatment with caffeine at different concentrations for 24 h, Huh7.5/SGR-Feo JFH-1 cells were stained with acridine orange (100 μg/μM) and observed under fluorescence microscopy. a) Stable replicon cells treated with caffeine diluent (negative control). b) Caffeine 0.250 mM. c) Caffeine 0.5 mM. d) Caffeine 1 mM. e) Caffeine 2 mM. f) Caffeine 4 mM. g) Curcumin 50 μM used as positive control of apoptosis. h) Graphic representation of apoptosis results. The assay was performed in two events with 20 fields, ***P < 0.0001 vs. control

Capítulo III

1 ARTIGO CIENTÍFICO 2

A Cafeína inibe a etapa de entrada do vírus da hepatite C e reduz a capacidade de liberação das partículas virais *in vitro*

Mariana N. Batista^a, Bruno M. Carneiro^a, Ana Cláudia S. Braga^a, Paula Rahal^{a*}

^aDepartamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Resumo

A Hepatite C Crônica é um problema de saúde global que afeta cerca de 3 % da população mundial e tem sido considerada a maior causa de transplante hepático. Não existem tratamentos específicos direcionados para entrada ou liberação viral que possam ser utilizados para etapas anteriores ou posteriores ao transplante hepático e o tratamento convencional, direcionado à replicação viral, não é completamente eficaz. A cafeína é apresentada como um potente controlador de doenças crônicas do fígado, e poderia afetar a infecção pelo HCV de duas formas complementares: melhorando as condições hepáticas e inibindo a replicação viral. Neste trabalho, analisamos o efeito da cafeína em diferentes etapas do ciclo replicativo do HCV, demonstrando uma inibição significativa da entrada do vírus na célula alvo induzida pela cafeína. Entretanto não houve efeito significativo da cafeína isoladamente na liberação das partículas virais.

Introdução

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C acomete cerca de 150 milhões de pessoas mundialmente [10]. Essa cronicidade pode levar ao desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular e tem sido considerada a maior indicação para transplante hepático. Interferon- α peguilado (PEG-INF) em associação com ribavirina (RBV) tem sido o tratamento padrão para pacientes com infecção crônica pelo HCV na última década [17] e atualmente

esse tratamento é administrado em associação a inibidores de protease. Este tratamento, leva a efeitos colaterais severos, possui alto custo e não é satisfatório para todos os pacientes. Além disso, não existe um tratamento padrão diretamente capaz de ser usado antes ou após o transplante hepático, o que limita a eficiência contra reinfecção. A cafeína mostrou alta potencia de inibição sobre a replicação do HCV *in vitro* [3] e tem sido associada a uma desaceleração de danos hepáticos causados por doenças crônicas do fígado [5, 7, 13]. Em adição, a cafeína tem sido associada à interação de algumas vias celulares relacionadas a entrada do HCV na célula hospedeira como as vias da ERK e da proteína quinase A [20] entretanto, não existem evidências sobre a relação direta da cafeína na entrada do HCV e o efeito desse fitoquímico não foi avaliado em outras etapas do ciclo replicativo deste vírus. Assim, o objetivo desse estudo foi estabelecer uma relação direta entre a cafeína e diferentes etapas do ciclo replicativo do HCV.

Material e Métodos

Replicon do HCV e linhagem celular. Para este estudo foi utilizado o replicon completo do HCV denominado JFH-1, um genoma monocistrônico completo do HCV pertencente ao genótipo 2a isolado de um paciente japonês com hepatite fulminante [18]. A linhagem contínua utilizada para a manutenção do ciclo replicativo do HCV foi a linhagem de hepatoma humano (Huh-7.5). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com penicilina/estreptomicina 100 UI/ μ g/mL, soro fetal bovino (FBS) 10% e 1% de aminoácidos não essenciais. Após os processos de transfecção/infecção, o meio foi suplementado com 1 % do tampão de ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico (HEPES).

Transfecção e infecção da linhagem Huh-7.5: As células Huh-7.5 foram transfectadas com RNA do replicon JFH-1 sob condições previamente descritas [3]. Após a transfecção os experimentos de entrada e liberação foram realizados durante o pico de infecção deste replicon atingido 14 dias após a transfecção, como previamente descrito [18]. A infecção intracelular foi acompanhada por ensaio de imunofluorescência indireta e o título viral analisado por titulação do sobrenadante infeccioso.

Ensaio de MTT: Para a análise da toxicidade celular da cafeína sobre a linhagem de células Huh-7.5, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços, 24 h antes do tratamento. No dia subsequente as células foram tratadas com concentrações de cafeína variando de 1 a 10 mM, durante 24 h. Ao fim da incubação, as células foram submetidas à ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, USA).

Análise da entrada viral: Para análise da entrada viral, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços 24 h antes da infecção. No dia da infecção, as células foram tratadas concomitantemente com HCVcc a um MOI de 0.2 [ffu]/célula e concentrações de cafeína a 1, 2, e 4 mM. A epigallocatequina-3-galato (EGCG) a 100 ug/mL foi utilizada como controle positivo de inibição da entrada do HCV [4]. A incubação do tratamento foi realizada durante 4 h, período referente ao intervalo de tempo anterior ao início da replicação viral e utilizado como tratamento padrão para ensaios de entrada viral para o HCV [1, 4].

Análise do efeito virucida da cafeína: A fim de determinar se a cafeína possui interação direta com glicoproteínas virais, o mesmo MOI de HCVcc foi adicionado às concentrações de cafeína descritas anteriormente. Essa mistura foi mantida em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ durante 1 h, anteriormente à adição nas células. Após esse período, a mistura foi adicionada às células previamente semeadas e incubadas por 4 h. Na sequência, o sobrenadante infeccioso foi substituído por meio DMEM completo fresco e as células incubadas por mais 72 h. A expressão de HCV pós-tratamento com cafeína foi avaliada por ensaio de formação de foco como previamente descrito [3].

Análise de Liberação de partículas virais: Para analisar a liberação de HCVcc, 2×10^5 das células transfectadas com o replicon JFH-1, apresentando cerca de 100 % de infecção, foram semeadas em placa de 6 poços 48 h antes do tratamento. Subsequentemente, o meio foi removido e novo meio DMEM suplementado com as drogas nas mesmas concentrações dos ensaios de entrada foi adicionado como previamente descrito [14]. Após 24 h de incubação, a placa foi gentilmente agitada para liberação mecânica das

partículas adsorvidas e o meio coletado, filtrado para remover restos celulares e estocado a - 80°C para mais análises. O RNA intracelular também foi coletado e estocado a - 80°C. O RNA intracelular total foi extraído utilizando-se o método TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o RNA extracelular foi extraído utilizando-se o kit QIAamp viral Mini (QIAGEN, CA, USA) . Este RNA foi utilizado para síntese de cDNA com o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise da expressão de HCV foi realizada pelo uso de TaqMan Universal PCR Master Mix no AmpErase UNG (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). A qualidade das amostras e os níveis normais de expressão celular foram obtidos por amplificação do gene endógeno GAPDH (tabela 1). Os resultados da inibição do JFH-1 foram calculados como porcentagem do controle negativo (meio sem droga).

Análise de expressão relativa e quantitativa de RNA viral: O RNA coletado e reversamente transcrito foi utilizado para análise de qPCR (*primers* e sondas indicados na tabela 1). Para análise de RNA extracelular foi determinada curva de Cts baseada em quantificação por FFU. Para a análise de RNA intracelular foi avaliada expressão relativa do RNA viral, o qual foi normalizado pelo gene endógeno GAPDH.

Análise de expressão de proteína viral: os títulos virais foram determinados pela infecção de células Huh-7.5 através de diluição seriada de sobrenadante e imunofluorescência indireta como previamente descrito [21].

Análises estatísticas: Cada experimento foi realizado em triplicata em três eventos independentes. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso de ANOVA one-way ou two-way e Tukey's post test ou Bonferroni post test respectivamente usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego - CA, USA).

Resultados

Análise citotóxica da cafeína sobre células Huh-7.5: A cafeína influenciou na viabilidade celular de maneira dose-dependente (**Figura 1**). Para os ensaios de entrada, a viabilidade celular foi considerada acima de 100 %, visto que a incubação utilizada foi de apenas 4 h. Para os ensaios de liberação, admitiu-se

o limite de viabilidade arbitrário de 80 %, incluindo para os demais ensaios as concentrações de 1, 2 e 4 mM de cafeína.

Avaliação da cafeína sobre o evento de entrada do HCV: Para verificar se a cafeína poderia interferir na etapa de entrada do HCV, seja por meio da modificação na expressão de proteínas celulares, seja por interações diretas com a partícula viral, as células de hepatoma humano Huh-7.5 foram infectadas com HCVcc a um MOI de 0.2 e tratadas concomitantemente com as seguintes concentrações de cafeína: 1, 2 e 4 mM. A cafeína demonstrou uma diferença estatisticamente significativa na inibição da entrada do HCV. Usando a droga a uma concentração de 4 mM, a quantidade de unidades formadoras de foco foi reduzida em cerca de 28 ± 3 % em relação ao controle, enquanto sob tratamento de 2 mM de cafeína, o número de focos foi reduzido em 20 ± 5 % em relação ao controle negativo (**Figura 2A**).

Análise do efeito virucida da cafeína: Para avaliar se a cafeína possui interação direta com proteínas virais, a droga foi adicionada ao sobrenadante viral antes da adição do mesmo às células. Nesta análise a cafeína apresentou inibição estatisticamente significativa da entrada do HCV, com máxima inibição de 50 % em relação ao controle para a cafeína na concentração de 1 mM (**Figura 2B**). Esse efeito foi reduzido de maneira dose-dependente com o aumento da concentração da droga. Possivelmente a cafeína atinja um plateau a 1 mM, entretanto concentrações menores da droga não foram avaliadas.

Avaliação da liberação do HCV após tratamento com cafeína: Para verificar se a cafeína poderia interferir na liberação de HCVcc, células Huh-7.5 infectadas foram tratadas com concentrações seguras de cafeína. A cafeína demonstrou inibição dose-dependente. Após tratamento com 4 mM de cafeína, os níveis extracelulares de RNA viral foram reduzidos em cerca de 10 ± 5 % em relação ao controle negativo e em comparação com os níveis intracelulares; enquanto a 2 mM, o RNA do HCV foi reduzido em cerca de 5 ± 3 % em relação ao controle negativo (**Figura 3**). Nenhum dos tratamentos com cafeína apresentou significância estatística em relação ao controle negativo (cafeína a zero).

Discussão

Neste estudo, foi demonstrado que a cafeína pode inibir diretamente a entrada do HCV genótipo 2a em células Huh-7.5. O co-tratamento HCV/cafeína, demonstrou que a cafeína possui efeito sobre a entrada do HCV e que este efeito é estreitamente dose-dependente. Quando testada na concentração de 4 mM (maior concentração não citotóxica para essa linhagem celular nesse período), a cafeína inibiu a entrada viral em torno de 30 % em relação ao controle negativo. Este efeito foi melhorado pela exposição das partículas virais a um tratamento prévio com a droga, o qual aumentou a potencia de inibição da entrada viral em quase duas vezes (50 %) em uma concentração 4 vezes menor (1 mM de cafeína). Entretanto esse efeito não demonstrou uma dose dependência atingindo nessa concentração um *plateau* de inibição. Isso sugere uma interação direta entre a cafeína e proteínas/estruturas virais.

Não existem na literatura, estudos moleculares sobre a interação entre cafeína e proteínas do HCV, assim mais estudos são necessários sobre esse efeito virucida da cafeína.

A entrada do vírus na célula hospedeira é mediada pela interação de glicoproteínas e glicosaminoglicanos [2] e é mediada por vários fatores celulares. Alguns desses fatores incluem vias relacionadas à proteína quinase A (PKA); o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o receptor de efrina A2 (EphA2) e a proteína ERK, os quais estão relacionadas a expressão de receptores celulares usados durante a infecção pelo HCV [9, 12]. A cafeína possui influência em algumas dessas vias e tem sido associada com a ativação da via MEK/ERK/EGFR na linhagem de hepatoma HepG2. Entretanto, essa via não foi significativamente modulada pela cafeína em células Huh7 [15]. Por outro lado, a cafeína pode reduzir a fosforilação de ERK em outras linhagens celulares [8, 11, 20] e pode reduzir a expressão de PKA em células estreladas hepáticas [19]. A inibição de PKA tem sido associada com alteração do padrão de CLDN1 e assim associada a limitação da entrada do HCV [6]. Acreditamos que o tratamento com cafeína durante 4 h não é capaz de alterar a expressão gênica celular, uma vez que muitos trabalhos executando o mesmo período de

tratamento mostraram que nesse período de incubação, a expressão dos receptores conhecidos utilizados pelo HCV foi mantida inalterada [1, 4].

Possivelmente a expressão gênica celular possa ser atingida se a cafeína for adicionada como um pré-tratamento, uma vez que a cafeína interage diretamente com algumas vias celulares relacionadas à entrada viral. Assim, mais estudos são requeridos para avaliar a expressão de vias celulares de células tratadas com cafeína bem como a interação entre cafeína e proteínas virais.

A cafeína possui um efeito discreto sobre a liberação viral, o qual isoladamente não seria considerado efetivo contra o vírus, mas que é uma boa característica associada a todas as outras funções atribuídas à cafeína sobre o ciclo replicativo. Assim, todas essas funções da cafeína sugerem que esta possa ser utilizada em associação ao tratamento convencional, tratando a infecção crônica, bem como pré ou pós-tratamento de pacientes submetidos a transplante hepático.

Em conclusão, os dados apresentados nesse estudo demonstraram que a cafeína pura inibe significativamente a entrada do HCV, genótipo 2a em células Huh-7.5 e discretamente a liberação do HCV *in vitro*. Entretanto um mecanismo definitivo do efeito inibitório da cafeína não foi estabelecido.

Demonstramos que a cafeína tem ação para diferentes etapas do ciclo viral, entretanto mais estudos das vias celulares e de proteínas expressas sob a exposição da cafeína, bem como um método de entrega eficiente são necessários.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Professor Mark Harris (University of Leeds, UK) por fornecer o anticorpo policlonal anti-NS5A e à CAPES e FAPESP (processo: **2012/19074-1**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não têm conflito de interesse.

Referências

1. Anggakusuma, Colpitts CC, Schang LM, Rachmawati H, Frentzen A, Pfaender S, Behrendt P, Brown RJ, Bankwitz D, Steinmann J, Ott M, Meuleman P, Rice CM, Ploss A, Pietschmann T, Steinmann E (2014) Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut* 63: 1137-49
2. Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF (2006) Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of virology* 80:10579-10590
3. Batista MN, Carneiro BM, Braga ACS, Rahal P. (2014) Caffeine inhibits Hepatitis C virus replication *in vitro*. *Arch Virol*
4. Ciesek S, von Hahn T, Colpitts CC, Schang LM, Friesland M, Steinmann J, Manns MP, Ott M, Wedemeyer H, Meuleman P, Pietschmann T, Steinmann E (2011) The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 54:1947-1955
5. Costentin CE, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES, Medkour F, Pawlotsky JM, Mallat A, Hezode C (2011) Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 54:1123-1129
6. Farquhar MJ, Harris HJ, Diskar M, Jones S, Mee CJ, Nielsen SU, Brimacombe CL, Molina S, Toms GL, Maurel P, Howl J, Herberg FW, van Ijzendoorn SC, Balfe P, McKeating JA (2008) Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity. *Journal of virology* 82:8797-8811
7. Freedman ND, Everhart JE, Lindsay KL, Ghany MG, Curto TM, Shiffman ML, Lee WM, Lok AS, Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Hoefs JC, Dienstag JL, Morishima C, Abnet CC, Sinha R, Group H-CT (2009) Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 50:1360-1369
8. Kang CH, Jayasooriya RG, Dilshara MG, Choi YH, Jeong YK, Kim ND, Kim GY (2012) Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-kappaB activation and ERK phosphorylation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50:4270-4276
9. Kim S, Ishida H, Yamane D, Yi M, Swinney DC, Fong S, Lemon SM (2013) Contrasting roles of mitogen-activated protein kinases in cellular entry and replication of hepatitis C virus: MKNK1 facilitates cell entry. *Journal of virology* 87:4214-4224

10. Lavanchy D (2011) Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17:107-115
11. Lu PZ, Lai CY, Chan WH (2008) Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *International journal of molecular sciences* 9:698-718
12. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoel M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF (2011) EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature medicine* 17:589-595
13. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH (2010) Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 51:201-209
14. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML (2008) Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47:1437-1445
15. Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y (2008) Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 102:543-551
16. Ravikumar YS, Ray U, Nandhitha M, Perween A, Raja Naika H, Khanna N, Das S (2011) Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthus amarus* as potent natural source. *Virus research* 158:89-97
17. Vermehren J, Sarrazin C (2012) The role of resistance in HCV treatment. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 26:487-503
18. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* 11:791-796
19. Wang H, Guan W, Yang W, Wang Q, Zhao H, Yang F, Lv X, Li J (2014) Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway. *PloS one* 9:e92482
20. Zeitlin R, Patel S, Burgess S, Arendash GW, Echeverria V (2011) Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK

activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain research* 1417:127-136

21. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9294-9299

TABELAS

Tabela 1. *Primers* e sondas usados na amplificação e detecção da região 5'UTR do HCV e do gene endógeno GAPDH em ensaio de qPCR.

| Gene | Sequência do <i>Primer</i> 5' – 3' | Sequência da sonda 5' – 3' |
|-------------------------|---|--|
| ¹ HCV 5' UTR | F – CGGGAGAGCCATAGTGG R – AGTACCAACAAGGCCTTTCG | 6-FAM- CTGCGGAACCGGTGAGTACAC- TAMRA |
| GAPDH | F – GGTGGTCTCCTCTGACTT R – CCAAATTCGTTGTCATACCAGGAAATG | 6-FAM CGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGC –TAMRA |

¹ Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M (1999) Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 116:636-642

FIGURAS

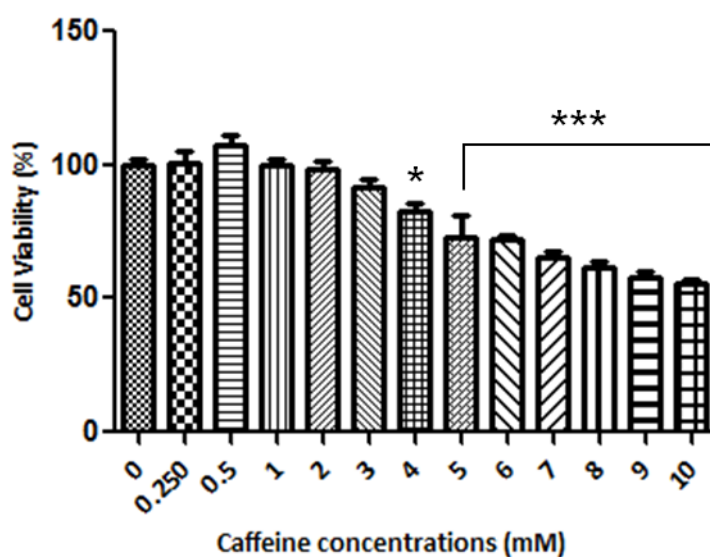


Figura 1. Perfil citotóxico da cafeína sobre a linhagem celular Huh-7.5. A viabilidade celular da linhagem Huh-7.5 estavelmente expressando o replicon SGR-JFH-FEO foi avaliada por ensaio de MTT 24 h após o tratamento com concentrações de cafeína variando de zero (controle negativo) a 10 mM.

* $P > 0.05$ vs. Controle negativo

*** $P > 0.01$ vs. Controle negativo

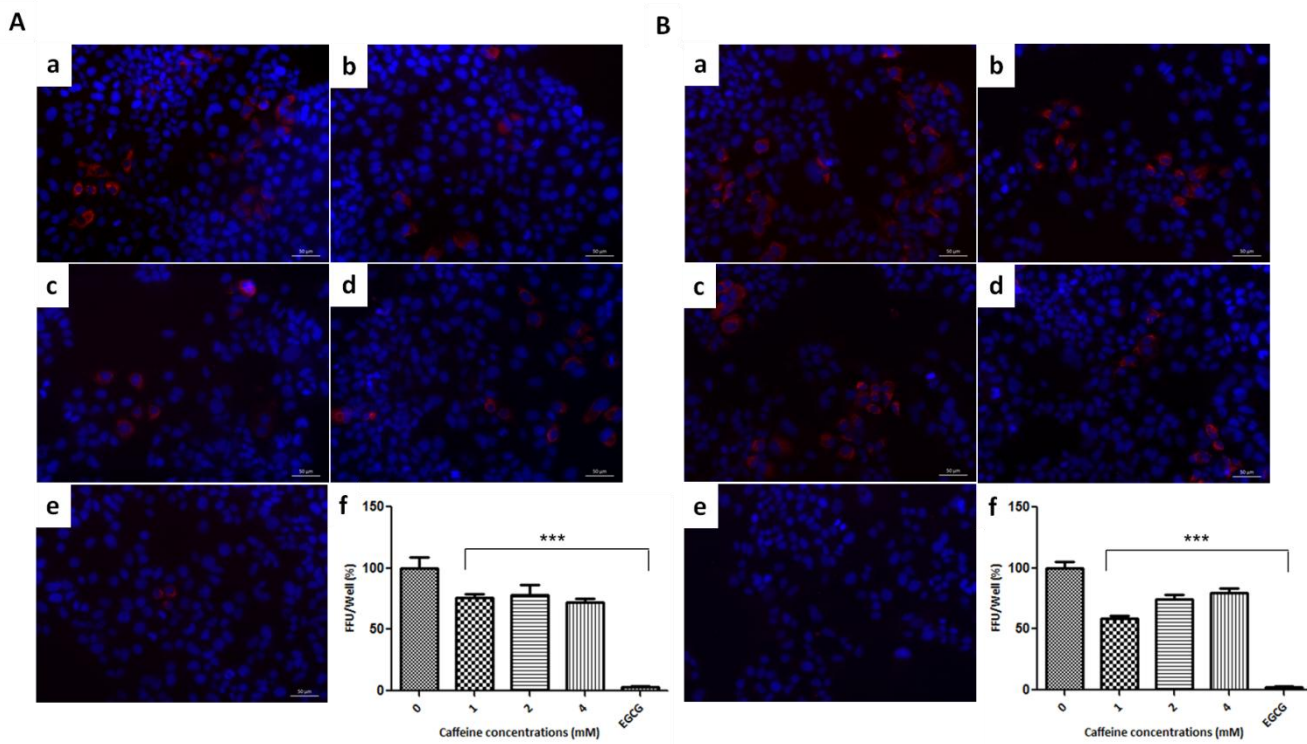


Figura 2. Inibição da entrada do HCV pela cafeína. A) A expressão de proteína NS5A foi avaliada por imunofluorescência indireta e quantificada por contagem de unidades formadoras de focos fluorescentes (FFU). As células foram tratadas com as seguintes concentrações de cafeína: a) Controle negativo (zero); b) 1 mM; c) 2 mM; d) 4 mM, e) EGCG; as quais possuem 100% de viabilidade em 4 h. As células do controle negativo foram tratadas com água milli-Q e as do controle positivo com EGCG 100 µg/mL. f) Representação gráfica dos resultados de contagem de foco. B) Análise virucida realizada nas mesmas concentrações que o ensaio de entrada. a) Controle negativo (zero); b) 1 mM; c) 2mM; d) 4 mM, e) EGCG. f) Representação gráfica dos resultados de contagem de foco para o ensaio virucida.

***P > 0.01 vs. Controle negativo

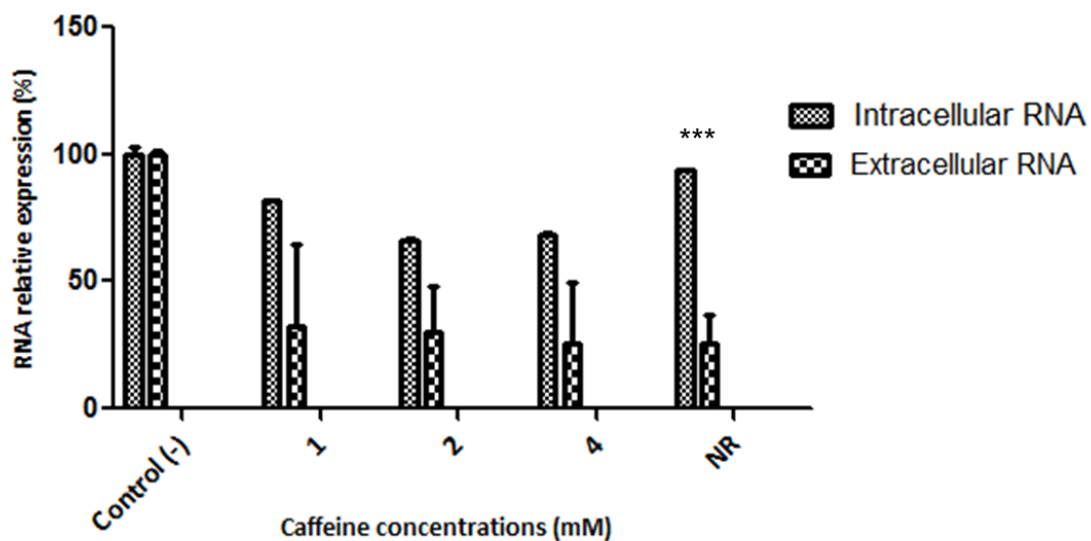


Figura 3. Inibição da liberação do HCV pela cafeína. A inibição do RNA de JFH-1 foi demonstrada por qPCR para a região 5'UTR do HCV. As células foram tratadas com cafeína nas concentrações: Controle negativo (zero); 1 mM; 2 mM; 4 mM, e Naringenina (NR). O controle negativo foi tratado com água milli-Q e o controle positivo foi tratado com Naringenina 200 μ M. As barras representam triplicatas de três experimentos independentes.

***P > 0.01 vs. controle negativo

Capítulo IV

1 DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C causa uma inflamação de evolução lenta que tem sua grande mortalidade associada à fase crônica da doença, caracterizada por cirrose hepática e/ou câncer hepatocelular (WHO, 2013). A cafeína é associada em um grande número de estudos, à melhora de vias metabólicas hepáticas e enzimas indicativas de dano hepático (FREEDMAN *et al.*, 2009; MODI *et al.*, 2010; CONSTENTIN *et al.*, 2011). Além disso, o consumo de cafeína foi associado à desaceleração da evolução de doenças hepáticas crônicas (MODI *et al.*, 2010) e, portanto está altamente associada ao melhoramento da bioquímica anormal do fígado inclusive em casos crônicos de hepatite C.

Através da avaliação do perfil de citotoxicidade da cafeína aqui apresentado para a linhagem Huh-7.5 foi possível associar a cafeína a um aumento na citotoxicidade celular tempo e dose-dependente. Esse padrão já foi descrito por Okano *et al.* (2008) para algumas linhagens tumorais de hepatócitos como Huh-7, HepG2, HLF e PLC/PRF/5 e por Lu *et al.* (2008) em osteoblastos. Como já foi verificada a capacidade da cafeína em interferir na proliferação de células tumorais (OKANO *et al.*, 2008; KAWANO *et al.*, 2012), possivelmente a viabilidade celular pudesse ser aumentada se a droga fosse testada em células não-tumorais como hepatócitos primários ou imortalizados. Devido a essa característica particular da cafeína e para garantir que a inibição viral fosse independente de alterações no estado fisiológico celular, já que o modelo utilizado eram células tumorais, foram realizados ensaios de apoptose, ciclo celular e de autofagia, condições celulares descritas na literatura como alteradas pelo tratamento com cafeína (OKANO *et al.*, 2008; KAWANO *et al.*, 2012; SINHA *et al.*, 2014). Entretanto não foram observadas modificações estatisticamente significativas para esses estados fisiológicos celulares nos períodos e concentrações avaliados.

No presente estudo foi claramente demonstrada a capacidade da cafeína em reduzir a replicação do HCV, com IC₅₀ de 0.723 mM após 48 h de tratamento. Este efeito foi observado tanto para o replicon subgenômico do HCV quanto para o replicon completo do vírus, ambos pertencentes ao genótipo 2a. Esses dados sugerem a cafeína como uma droga com potencial antiviral interessante, visto que pode simultaneamente inibir a replicação viral e

amenizar os efeitos crônicos da doença (CADDEN; PARTOVI; YOSHIDA, 2007; FREEDMAN *et al.*, 2009; MODI *et al.*, 2010; COSTENTIN *et al.*, 2011). Além disso, por atuar na redução do dano hepático, no caso de ser utilizada em associação ao tratamento convencional da hepatite C, poderia possivelmente reduzir a toxicidade do tratamento, visto que melhora o funcionamento de vias de detoxificação (TAO *et al.*, 2008). Em adição, resultados prévios em nosso laboratório, demonstraram a capacidade da cafeína potencializar o efeito do tratamento com PEG-IFN- α em células Huh-7 expressando estavelmente o replicon SGR-JFH-1 de genótipo 2a (dados não apresentados).

A replicação viral é um passo essencial na manutenção da infecção e é um importante alvo para terapia antiviral. Recentemente muitos grupos vêm elucidando o uso de antivirais de ação direta (DAAs) contra a infecção pelo HCV (BARTENCHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013), contudo a eficiência dos DAAs é limitada porque induz rapidamente a emergência de variantes resistentes (HALFON; SARRAZIN, 2012). Em contrapartida, a cafeína inibe a replicação viral de maneira ainda indeterminada, mas possui muitos alvos celulares que poderiam estar envolvidos nesse processo de inibição como as proteínas HSP90 (OKAMOTO *et al.*, 2006; NAKAGAWA *et al.*, 2007; BERAN *et al.*, 2012); redução da fosforilação de proteínas da via Ras-ERK (OKANO *et al.*, 2008; YI *et al.*, 2011; ZEITLIN *et al.*, 2011) e a expressão da cicloxigenase 2 (COX-2) (GRETTON *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012). A inibição de alvos celulares críticos para a infecção pelo HCV é uma estratégia promissora para driblar a resistência viral, visto que são alvos mais estáveis que genes virais, os quais não passam por atividade corretiva e têm alta propensão a selecionar mutações. Além disso, alvos celulares abrangeriam uma maior variedade de genótipos do HCV (WOHLFARTH; EFFERTH, 2009).

É importante ressaltar que esse é o primeiro trabalho que relaciona diretamente a cafeína à replicação do HCV *in vitro* e, somente é possível comparar nossos resultados com dados clínicos disponíveis na literatura. Segundo Modi e colaboradores (2010), em um estudo clínico avaliando o consumo de cafeína e a evolução de fibrose em pacientes portadores de HCV, não houve alteração dos títulos virais no soro desses pacientes relacionado ao consumo de cafeína (MODI *et al.*, 2010). Já Freedman e colaboradores (2009)

demonstraram um aumento, ainda que discreto na carga viral dos pacientes, proporcional ao aumento do consumo de cafeína. No entanto, os resultados desses trabalhos não se corroboram, bem como não existem outros dados na literatura que apresentem abordagem semelhante à utilizada no presente estudo, tornando a afirmação relacionada à carga viral em pacientes inconclusiva, e, impossibilitando a comparação dos dados obtidos no presente trabalho com os testes clínicos. Assim ensaios *in vivo* são necessários para isolar as variáveis envolvidas nos estudos clínicos e verificar os reais efeitos associados à cafeína na replicação viral. Por outro lado, estes dados podem ser explicados pelo fato de que as concentrações avaliadas no presente estudo foram muito mais altas que as concentrações verificadas para o consumo normal de cafeína, bem como uma maior quantidade de variáveis puderam ser controladas dentro de ensaio *in vitro*.

Em adição ao efeito inibitório da cafeína sobre a replicação viral, também demonstramos nesse trabalho que tratamentos em concentrações similares igualmente viáveis, evidenciaram que a cafeína possui ainda um efeito inibitório sobre a etapa de entrada do vírus na célula hospedeira. Esse efeito variou entre 28 e 50 %. Para tratamento com adição simultânea da droga e do sobrenadante infeccioso na cultura celular, o efeito foi mais brando, atingindo máximo de 28 % de inibição. Entretanto, ao ser incubado anteriormente à adição em cultura celular, o tratamento melhorou em torno de 20 %, atingindo cerca de 50 % de inibição da entrada viral.

Além de possuir a capacidade de alterar a expressão de vias celulares utilizadas para a replicação do vírus da hepatite C, a cafeína já foi associada à inibição de proteínas necessárias no evento de entrada do vírus na célula (KATSAROU *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2012). Dentre as diversas vias celulares inibidas pela cafeína, destacamos duas importantes proteínas associadas a receptores celulares cruciais a entrada do vírus na célula. A proteína kinase A (PKA) que tem sua inibição associada à alteração no padrão de expressão do receptor celular CLDN1 (FARQUHAR *et al.*, 2008), o qual está envolvido no processo de endocitose da partícula viral pela célula hospedeira (BARTENHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013); e a proteína ERK que tem sido relacionado ao processo de adsorção da partícula viral uma vez que modula a expressão do receptor celular CD81 (BRAZZOLI *et al.*, 2008),

associado a processos iniciais de reconhecimento da proteína E2 pela célula hospedeira. Em ambos os casos a inibição dessas proteínas celulares implica em limitação da entrada do HCV na célula hospedeira. A cafeína já foi associada com a inibição da proteína PKA em células hepáticas estrelatas (WANG *et al.*, 2014) e tem influencia sobre a proteína ERK parcialmente indeterminada, com ausência de efeito em células Huh-7 (OKANO *et al.*, 2008) e com inibição da forma fosforilada dessa quinase em células da micróglia, osteoblastos e células do córtex de camundongos (LU *et al.*, 2008; ZEITLIN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012). Não há dados na literatura sobre a expressão dessa quinase na linhagem Huh 7.5

Embora existam várias possibilidades de vias pelas quais a cafeína possa influenciar a inibição da entrada viral, o período de tratamento avaliado possivelmente não é capaz de alterar o padrão de expressão gênica celular. Assim como previamente descrito na literatura para outros fitoquímicos com tratamentos em períodos similares e capacidade inibitória da entrada viral, a expressão de receptores/ co-receptores celulares é mantida inalterada após 4 h de tratamento (CIESEK *et al.*, 2011; ANGGAKUSUMA *et al.*, 2014). Existindo assim a possibilidade de que a cafeína possua um efeito ainda mais potente se aplicada como um pré-tratamento ao invés de um co-tratamento.

A cafeína não demonstrou efeito inibitório significativo na parte final do ciclo replicativo viral, sendo a inibição apresentada associada a efeitos inibitórios da replicação viral, visto que a redução de partículas virais no sobrenadante acompanha a redução da expressão viral intracelular. Como não existem meios de se separar *in vitro* o efeito nessas diferentes etapas, admitiu-se que os efeitos observados na liberação viral estão diretamente associados ao efeito inibitório da replicação viral pela cafeína.

2 CONCLUSÃO

No presente estudo, a cafeína foi diretamente associada a uma redução na replicação, entrada e liberação do HCV, sem afetar a fisiologia celular de maneira drástica, garantindo assim que para esse modelo o efeito desse fitoquímico não altera padrões fisiológicos celulares associados à morte celular. Entretanto permanecem sem determinação os meios pelos quais a cafeína afeta o ciclo replicativo do HCV e mais estudos são necessários para que se determine o mecanismo de ação da cafeína sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo deste vírus e para o desenvolvimento de métodos de entrega específicos para o fígado que regule a toxicidade para aplicação *in vivo*.

3 PROBLEMAS E PERSPECTIVAS

A grande problemática associada à cafeína está relacionada a possíveis efeitos colaterais do fármaco quando avaliado *in vivo*. A faixa de tolerância neural e cardíaca *in vivo* para a cafeína é limitada e para que houvesse viabilidade para um tratamento, seria necessário o estudo de métodos de entrega eficientes que limitassem a liberação do fármaco de maneira alvo-específica ou ainda estudos de modificações moleculares que alterassem o perfil de toxicidade sem alterar a capacidade de inibição viral e tumoral. Como perspectivas, portanto aparecem o estudo de métodos de entrega eficientes da droga bem como um maior conhecimento da relação droga/vírus/célula hospedeira. Para que, modificações moleculares mantendo a eficiência da droga aliada à redução na toxicidade possam apresentar um tratamento eficaz, de baixos efeitos colaterais aliado à melhora no quadro geral dos pacientes pelo efeito intrínseco da cafeína de inibição viral associado a efeito amenizador do quadro crônico da doença.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGGAKUSUMA, COLPITTS CC, SCHANG LM, RACHMAWATI H, FRENTZEN A, PFAENDER S, BEHRENDT P, BROWN RJ, BANKWITZ D, STEINMANN J, OTT M, MEULEMAN P, RICE CM, PLOSS A, PIETSCHMANN T, STEINMANN E. Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. **Gut**, v. 7, n. 63 p. 1137-49 , Jul 2014.

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. 482-96, Jul 2013.

BERAN, R. K. et al. Cellular growth kinetics distinguish a cyclophilin inhibitor from an HSP90 inhibitor as a selective inhibitor of hepatitis C virus. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30286, 2012.

BRAZZOLI, M., BIANCHI, A. FILIPPINI, S. ; WEINER, A ZHU, Q.; PIZZA, M.; CROTTA, S. CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. **J. Virol**, v.82, n.17 , p. 8316-29, Sep 2008.

CADDEN, I. S.; PARTOVI, N.; YOSHIDA, E. M. Review article: possible beneficial effects of coffee on liver disease and function. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 26, n. 1, p. 1-8, Jul 1 2007.

CIESEK, S. et al. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 1947-55, Dec 2011.

COSTENTIN, C. E. et al. Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v. 54, n. 6, p. 1123-9, Jun 2011.

FARQUHAR MJ, HARRIS HJ, DISKAR M, JONES S, MEE CJ, NIELSEN SU, BRIMACOMBE CL, MOLINA S, TOMS GL, MAUREL P, HOWL J, HERBERG FW, VAN IJZENDOORN SC, BALFE P, MCKEATING JA .Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity. **J. Virol**, v. 82, n.17, p. 8797-8811, Sep 2008.

FREEDMAN, N. D. et al. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 50, n. 5, p. 1360-9, Nov 2009.

GRETTON, S.; HUGHES, M.; HARRIS, M. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signalling. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 3, p. 671-80, Mar 2010.

HALFON; SARRAZIN. Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: is resistance important? **Liver Int.** v. 32; Suppl 1, p.79-87. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02716.x, Feb 2012.

KANG, N. J. et al. Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 6, p. 921-8, Jun 2011.

KANG, C. H. et al. Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-kappaB activation and ERK phosphorylation. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 12, p. 4270-6, Dec 2012.

KATSAROU, K. et al. Endocytosis of hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles induces MAPK-ERK1/2 signaling events. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 14, p. 2491-506, Jul 2010.

KAWANO Y, NAGATA M, KOHNO T, ICHIMIYA A, IWAKIRI T, OKUMURA M, ARIMORI K. Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. **Biol Pharm Bull.**; n. 35, v.3, p. 400-7, 2012.

LEE, J. C. et al. Anti-hepatitis C virus activity of Acacia confusa extract via suppressing cyclooxygenase-2. **Antiviral Res**, v. 89, n. 1, p. 35-42, Jan 2011.

LIN, Y. T. et al. Green tea phenolic epicatechins inhibit hepatitis C virus replication via cyclooxygenase-2 and attenuate virus-induced inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54466, 2013.

LU PZ, LAI CY, CHAN WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. **Int J Mol Sci.**, v. 9, n.5, p. 698-718, May 2008.

MODI, A. A. et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 201-9, Jan 2010.

NAKAGAWA, S. et al. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 4, p. 882-8, Feb 23 2007.

OKAMOTO, T. et al. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. **EMBO J**, v. 25, n. 20, p. 5015-25, Oct 18 2006.

OKANO, J. et al. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102, n. 6, p. 543-51, Jun 2008.

SINHA RA, FARAH BL, SINGH BK, SIDDIQUE MM, LI Y, WU Y, ILKAYEVA OR, GOODING J, CHING J, ZHOU J, MARTINEZ L, XIE S, BAY BH, SUMMERS SA, NEWGARD CB, YEN PM. Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. **Hepatology**, v.59, n.4, p.1366-1380, Apr 2014.

TAO, Z. et al. Quantitative measure of cytotoxicity of anticancer drugs and other agents. **Anal Biochem**, v. 381, n. 1, p. 43-52, Oct 1 2008.

WANG WH, CHIANG IT, DING K, CHUNG JG, LIN WJ, LIN SS, HWANG JJ
Curcumin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma j5 cells: critical role of ca(+2)-dependent pathway. **Evid Based Complement Alternat Med.**, eCAM 2012:512907,2012.

WHO, world Health Organization, 2013.

Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>> Acesso em 13/03/14

WOHLFARTH, C.; EFFERTH, T. Natural products as promising drug candidates for the treatment of hepatitis B and C. **Acta Pharmacol Sin.**, v.30, n. 8, p. 25-30, Jan 2008.

YI, Z. et al. Hepatitis C virus co-opts Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1 for its genome replication. **J Virol**, v. 85, n. 14, p. 6996-7004, Jul 2011.

ZEITLIN, R. et al. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. **Brain Res**, v. 1417, p. 127-36, Oct 12 2011.