

EPATITE C E CURE NATURALI

A cura della dott.ssa Ada Vero

INTRODUZIONE

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è un problema di salute pubblica che colpisce circa 185 milioni di persone nel mondo, rappresentando quasi il 3% della popolazione. Nel nostro Paese, si stima che i pazienti portatori cronici del virus HCV siano oltre un milione, di cui 330.000 con cirrosi. L'Italia ha il triste primato in Europa per numero di soggetti HCV positivi e mortalità per tumore primitivo del fegato [1]. Nella malattia cronica da HCV l'obiettivo della terapia è l'eradicazione dell'infezione così da evitare la progressione dell'epatite cronica in cirrosi e prevenire le complicanze della cirrosi epatica come il carcinoma epatocellulare dopo 10-30 anni dall'infezione [1-2]. Non esiste un vaccino efficace per la prevenzione dell'infezione da HCV, tuttavia sono disponibili numerosi farmaci per il trattamento dell'infezione. La disponibilità di antivirali ad azione diretta (DAAs) ha migliorato drasticamente le opzioni terapeutiche, tuttavia, i costi elevati e il potenziale sviluppo della resistenza confermano la necessità di sviluppare nuovi antivirali più efficienti o una combinazione di terapie capaci di agire su diverse fasi del ciclo vitale virale. Negli ultimi decenni, sono stati condotti studi approfonditi su un'ampia varietà di composti naturali [3, 4]; tali farmaci caratterizzati da elevata diversità chimica [5] possono fornire un approccio alternativo al trattamento convenzionale.

CICLO DI REPLICAZIONE DELL'HCV

L'HCV è un virus del genere *Hepacivirus* della famiglia *Flaviviridae* [6]. Il suo RNA genomico a filamento singolo con polarità positiva è lungo all'incirca 9.600 nucleotidi [7, 8]. Il virus è dotato di un pericapside a composizione prevalentemente lipidica e di un capsidico icosaedrico contenente una molecola di RNA. La penetrazione del virus all'interno della cellula può avvenire per endocitosi o per fusione. Il virus, una volta all'interno della cellula, si libera della capsula proteica e libera il materiale genetico grazie agli enzimi lisosomiali. Dopo la spoliatura si verifica la replicazione del genoma e la sintesi delle proteine funzionali e strutturali. Le ultime fasi della replicazione consistono nell'assemblaggio, maturazione e liberazione dei nuovi virioni, essi una volta liberi, potranno infettare le cellule vicine, diffondendo l'infezione.

COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE CON PROPRIETÀ ANTI-HCV

La conoscenza approfondita del ciclo vitale e lo sviluppo di modelli di replicazione di HCV *in vitro* hanno portato alla scoperta di tre momenti chiave nel ciclo vitale del virus, punti aggredibili per arrestare la replicazione virale.

Il primo evento necessario perché si realizzi l'infezione è il contatto tra virus e cellula; successivamente, un legame specifico tra le glicoproteine di superficie e i recettori cellulari consente l'ingresso del virus mediante endocitosi mediata da recettore. L'attacco del virus alla cellula ospite è un interessante punto d'intervento per prevenire l'accesso del virione in cellule non infette. Tale processo *multistep* può essere inibito da piccole molecole, compresi i composti di origine naturale che hanno dimostrato di abrogare l'infettività da HCV.

Un'inibizione efficace delle prime fasi del ciclo di vita del virus è mediata dalle **lecitine griffithsin (GRFT, griffithsia sp.)** e dalla **proteina scitovirina (SVN, Scytonema varium)**; esse hanno caratteristiche strutturali uniche e sono in grado di legarsi a più porzioni glucidiche [9-13] presenti sulle glicoproteine dell'involucro (E1 e E2) di un certo numero di virus, bloccando l'ingresso nelle cellule bersaglio (SVN EC₅₀ 17 nM, GRFT EC₅₀ 0.4 nM; CC₅₀ = 34 mM).

Le **GRFT** hanno dimostrato, in studi condotti su modello murino immunodeficiente con grave infezione da HCV, di agire su un attivatore dell'u-plasminogeno, urochinasi appartenente alla classe delle idrolasi, determinando una riduzione dei livelli di HCV. Inoltre, l'azione delle GRFT è stata testata su un modello di topo transgenico, alla dose di 20 mg/kg/die per 18 giorni e anche in questo caso è stata osservata una riduzione dei livelli di HCV nel siero. Un recente studio ha valutato le proprietà anti-HCV dell'**acido gallico (GA)**, estratto di *Limonium sinense* (LS-UW), presente allo stato libero in alcune piante (radici del melograno, foglie del tè, ecc.). GA è in grado di inibire le prime fasi di azione di HCV, ovvero l'attaccamento e l'ingresso/fusione del virus nella cellula ospite, senza compromettere la replicazione virale, la traduzione e la propagazione da cellula a cellula [12] (EC₅₀ = 24,31 ± 6,90 µM; CC₅₀ = 346,59 ± 27,44 µM). L'acido gallico agisce anche inattivando specificamente virioni liberi e bloccando il legame del virus alla superficie della cellula ospite. Inoltre, l'interazione tra LS-UW e GA potrebbe causare effetti sinergici tali da aumentare l'efficacia anti-HCV.

Il secondo evento necessario perché si realizzi l'infezione è la replicazione del virus. L'enzima chiave della replicazione è l'RNA-polimerasi-RNA dipendente virus-specifica, che avvia la sintesi di un filamento di RNA antigenomico, utilizzando come stampo il genoma virale. La successiva produzione delle nuove particelle virali viene attivata dall'interazione dei monomeri di proteina *core* con i genomi neosintetizzati e porta alla formazione dei nucleocapsidi. Le particelle virali di nuova sintesi acquisiscono l'involucro esterno dal reticolo endoplasmatico della cellula ospite, dove vengono inserite le glicoproteine E1 ed E2. Il virione esce poi dalla

cellula per esocitosi. L'inibizione della replicazione dell'HCV attraverso il blocco della sintesi di genomi virali è una strategia promettente per lo sviluppo di nuovi antivirali.

La plumbagina (5-idrossi-2-metil-1,4-naftochinone) naftochinone presente principalmente nelle radici di *Plumbago indica* L., pianta appartenente alla famiglia delle *plumbaginaceae*, ha diverse attività biologiche tra cui azione antitumorale [14], antinfiammatoria, antimicrobica [15] e antivirale. Nello studio condotto da Hassan et al. (2016) è stato valutato l'effetto dose-dipendente della plumbagina sul ciclo di vita dell'HCV attraverso test *in vitro* su linee cellulari Huh-7.5 infette HCV FL-J6/JFH/JC1 [IC₅₀ di 0,57 µM/L] [16]. La plumbagina è in grado di aumentare l'espressione della proteina cellulare hA3G (fattore di restrizione della cellula ospite capace di limitare la replicazione del virus dell'epatite C) e diminuire l'espressione della proteina non strutturale NS3 (elicasi) in modo dose-dipendente [17]

Lo xantumolo (XN), molecola polifenolica della famiglia dei flavonoidi prenilati presente nell'inflorescenza femminile della pianta del luppolo *Humulus lupulus* L. (*Cannabaceae*) [18, 19] possiede diverse proprietà biologiche tra cui attività antitumorale [20], antinfiammatoria [21, 22] e antivirale [23-24]. Nello studio condotto da Lou et al. (2013) l'utilizzo di XN, in cellule Huh7.5 infette, alle concentrazioni di 7,05 o 14,11 µM inibisce la replicazione dell'HCV *in vitro* alla stessa maniera dell'IFN-α 2b [25]. La modalità di azione di XN sull'infezione da HCV sembra sia l'inibizione dell'espressione della sintesi dei trigliceridi influenzando l'azione di diacilglicerolo aciltransferasi-1 (DGAT1), che svolge un ruolo fondamentale per il reclutamento della proteina core dell'HCV nelle goccioline lipidiche e regola quindi l'assemblaggio virale, alterando l'attività della proteina di trasferimento dei trigliceridi microsomiali (MTP) [26-27].

L'apigenina, flavonoide naturale presente in varie specie di frutta e verdura (es. prezzemolo, cipolla, sedano, tè, pompelmo) è nota per essere un composto bioattivo, con proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, antiangiogeniche, antiallergiche, antigenotossiche e anticancerose [28, 29, 30]. L'apigenina diminuisce i livelli di MicroRNA122 (miR122) maturi [31] attraverso l'inibizione della fosforilazione di TRBP; il miR122, abbondantemente espresso nel fegato ed essenziale per la stabilità e la propagazione dell'RNA dell'HCV, regola positivamente la replicazione dell'HCV attraverso il legame al 5'-UTR del genoma dell'HCV [32, 33].

Anche l'assunzione di caffè [34-35] è associata a tassi più bassi di progressione della malattia epatica in pazienti con infezione cronica da HCV [36]. La caffeina agisce direttamente ed è in grado di ritardare la fibrosi, migliorare la funzione dei percorsi cellulari epatici e interferire con il ciclo di replicazione dell'HCV. Modi et al. (2010) [53], nello studio caso-controllo condotto su 170 pazienti (99 maschi, 104 di razza bianca, 121 con infezione da virus dell'epatite C cronica [HCV]), hanno osservato come il consumo di caffeina (circa 300 mg/die equivalenti alla caffeina presente in 2,25 tazze di caffè) sia associato a riduzione della fibrosi epatica e danno epatico [53].

Gli effetti della caffeina sulla replicazione dell'HCV sono stati valutati nel 2015 da Batista et al. (2015) attraverso studi condotti *in vitro* sulla linea cellulare Huh-7.5 infetta con HCV J6/JFH1 [37]. La caffeina inibisce efficientemente la replicazione dell'HCV [IC_{50} = 0,726 mM], in modo dose-dipendente, senza indurre apoptosi cellulare. Nello studio è stata anche valutata l'induzione dell'autofagia, ma non è stata trovata alcuna differenza significativa a parte una percentuale più elevata di cellule in uno stato autofagico.

La quercetina, flavonoide estratto da *Embelia Ribes* è presente in numerose specie vegetali tra cui: ippocastano, calendula, biancospino, camomilla, iperico e Ginkgo biloba [38]. È considerato un inibitore naturale di vari enzimi intracellulari come: tirosin-chinasi (TK); proteine chinasi (PKCs), 5-lipossigenasi, fosfolipasi A2 e ornitina decarbossilasi (ODC). La quercetina è in grado di inibire la replicazione dell'HCV, come dimostrato per la prima volta nel 2009 da Gonzalez et al. (2009), attraverso l'inibizione dell'espressione di HSP e la riduzione della sintesi delle proteine NS5A. Gli autori dello studio hanno identificato l'interazione tra HCV, NS5A e le proteine cellulari da shock termico (HSP) HSP40 e HSP70 che si pensa abbiano un ruolo nel ciclo di vita dell'HCV [39]. Nel 2012, Bachmetov et al. hanno identificato la quercetina come sostanza attiva responsabile dell'inibizione dell'attività della proteasi NS3 [40], in modo specifico dose-dipendente in un saggio di catalisi *in vitro*. Analizzando tutti i dati disponibili, l'elevata efficienza di inibizione della produzione di virus, fino al 70%, potrebbe essere attribuita ad un reciproco effetto inibitorio della quercetina sia sulla proteina NS3 che NS5A. Oltre a questi meccanismi inibitori descritti, Pisonero-Vaquero et al. hanno studiato nel 2014 l'azione della quercetina sullo stress ossidativo/nitrosativo (ROS/SNS) e sulla modulazione del metabolismo lipidico con conseguente inibizione della replicazione dell'HCV [41]. La quercetina diminuisce la generazione di ROS/RNS indotta dall'HCV (fino al 35%, 5 μ M) e la lipoperossidazione (fino al 30%, 5 μ M) in cellule infette. Il trattamento con quercetina infine, riduce significativamente l'accumulo di lipidi intracellulari in modo dose-dipendente e inibisce l'accumulo di lipidi indotto dal recettore X del fegato (LXR). L'inattivazione della via del fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) / AKT è il meccanismo coinvolto nella modulazione della lipogenesi LXRA e contribuisce all'inibizione della replicazione virale.

Il terzo evento necessario perché si realizzi l'infezione è l'assemblaggio e il rilascio del nuovo virione. Le particelle virali di nuova sintesi acquisiscono l'involucro esterno dal reticolo endoplasmatico della cellula ospite, dove vengono inserite le glicoproteine E1 ed E2; il passaggio nell'apparato di Golgi consente la maturazione finale della particella virale con la glicosilazione di E1 e E2. Il virione esce poi dalla cellula per esocitosi.

Tra i composti di origine naturale che inibiscono le ultime fasi del ciclo di vita dell'HCV la **naringenina**, flavanone abbondante negli agrumi con proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, anti-cancerogene, capace di ridurre i livelli di colesterolo sia *in vitro* che *in vivo* ha dimostrato elevata efficacia antivirale [42-43]. L'effetto inibitorio dose-dipendente di naringenina sul rilascio di HCV è stato analizzato nello studio *in vitro*

condotto nel 2008 da Nahmias et al. [27]. La linea cellulare Huh-7.5.1 di epatocarcinoma umano, particolarmente permissiva al virus dell'HCV, è stata trattata con il flavanone per 24 ore e ha dimostrato di inibire l'assemblaggio delle particelle di HCV intracellulari [45] attraverso l'attivazione di PPAR α . Il PPAR α , espresso nel fegato, è un fattore di trascrizione associato al metabolismo lipidico, correlato alla riduzione della lipogenesi e alla secrezione di VLDL [46], meccanismi estremamente correlati all'infettività da HCV a causa dell'effetto sull'assemblaggio virale. Trattando la linea cellulare Huh7.5.1 infetta (virus JFH1) con naringenina 200 μ M o con agonista PPAR α classico (WY14643) alla concentrazione 10 μ M, è stato analizzato come la naringenina o il WY14643 causino un'inibizione della secrezione dell'HCV RNA e non influenzino i livelli intracellulari di HCV RNA. La naringenina è stata anche co-incubata con WY14643 dimostrando il possibile effetto della naringenina nell'attivazione di PPAR α .

AGENTI ANTIVIRALI AD AMPIO SPETTRO

La **silimarina** estratta dal *Silybum marianum* (cardo mariano) è una miscela di flavolignani che da anni viene utilizzata nel trattamento di un gran numero di disturbi epatici, comprese la cirrosi, la steatosi alcolica, l'intossicazione epatica o l'epatite virale. Il complesso di flavonolignani, negli studi condotti in vitro, è in grado di inibire l'ingresso del virus, l'espressione di RNA e proteine, la produzione di virus e la diffusione del virus da cellula a cellula [47] oltre avere effetto epatoprotettivo sulle cellule trattate [48]. Nel 2007, Polyak et al., hanno analizzato il meccanismo d'azione della silimarina che potrebbe essere l'inibizione dell'attività della polimerasi NS5B [49]. Blaising et al. [2013] hanno successivamente testato i singoli composti purificati ed estratti di silimarina ovvero *silibina A*, *isosilibina A*, *silibina B*, *isosilibina B*, *silibinina*, *silicristina*, *taxifolina*, *isosilicristina* e *silidianina* dimostrando che la *silibinina* è il principale inibitore della fusione dell'HCV [50]. Attraverso studi di *imaging* di cellule viventi in microscopia confocale tridimensionale, gli autori hanno osservato il traffico intracellulare di HCV nelle cellule ospiti e hanno notato che la silibinina blocca il traffico endosomico nella linea cellulare Huh-7.5. L'ingresso dell'HCV in cellule ospiti è un processo complesso che implica la presenza dei recettori CD81, OCLN, CLDN1 e SRB1 ed è associato al recettore clatrina capace di mediare l'endocitosi [49, 51]. La silibinina inibisce l'ingresso di HCV negli epatociti umani ostacolando l'endocitosi mediata da clatrina e di conseguenza l'ingresso virale [52].

PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni, i trattamenti standard contro l'epatite C hanno mostrato diversi miglioramenti ma ad oggi molti problemi rimangono irrisolti, come la difficoltà di raggiungere una risposta ottimale nella totalità dei pazienti trattati e la possibilità di fallimenti terapeutici conseguenti a, o tali da indurre, l'insorgenza di resistenze. I prodotti naturali rappresentano una buona alternativa per lo sviluppo di nuovi farmaci nel trattamento dell'HCV. La maggior parte dei composti derivati dalle piante citati in questo studio ha mostrato risultati promettenti nell'analisi *in vitro* (Tabella 1). Tuttavia, sono necessarie ulteriori studi per confermare l'effetto dei composti *in vivo*.

TABELLA 1. COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE, CON ATTIVITÀ ANTIVIRALE, TESTATI *IN VITRO*

COMPOSTO	PIANTA	STEP DI INIBIZIONE VIRALE	GENOTIPO HCV	EC ₅₀	CC ₅₀	BIBLIOGRAFIA
Griffithsin	Griffithsia sp.	Ingresso del virus	1b, 2a	0,4nM	33,6 nM	[11]
Scitovirina	Scytonema varium	Ingresso del virus	1b, 2a	17 nM	23.8 μM	[10]
Acido gallico	Limonium sinense	Ingresso del virus	2a	24.31 ± 6.90 μM	346.59 ± 27.43 μM	–
Plumbagina	Plumbago indica L.	Replicazione	2a	0.57 μM	30.65 ± 1.25 μM/L	[16]
Xantumolo	Humuls L.	Replicazione	2 a	–	–	[25]
Apigenina	Flavone	Replicazione	2a	–	–	[31]
Caffeina	Alcaloide	Replicazione	2a	0.726 mM	–	[37]
Quercitina	Embelia Ribes	Replicazione	1a, 2a, 1b	–	–	[40-41]
Narigenina	Flavanone	Rilascio/ assemblaggio	2a	–	–	[27]
Silimarina	Silybum marianum	Ingresso e replicazione del virus	2a, 1a, 1b, 3a	5 μM	–	[48-49-53]

BIBLIOGRAFIA

1. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 558-567.
2. Thomas DL. Global Control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat. Med. Nat Publ Group.* 2013; 19:850
3. Kotwal GJ. Natural Antivirals against Human Viruses. *Virol. Mycol.* 2014;3.
4. De Clercq E. Highlights in antiviral drug research: antivirals at the horizon. *Med Res Rev.* 2013; 33:1215–1248.
5. Kitazato K, Wang Y, Kobayashi N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. *Drug Discov Ther.* 2007; 1:14–22.
6. Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 369:1–15.
7. Murakami K, Abe M, Kageyama T, Kamoshita N, Nomoto A. Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol.* 2001; 146:729–741.
8. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol.* 2001; 75:12047–12057.
9. Choi M, Kim Y-M, Lee S, Chin Y-W, Lee C. Mangosteen xanthones suppress hepatitis C virus genome replication. *Virus Genes.* 2014; 49:208–222.
10. Mcfeeters RL, Xiong C, O'Keefe BR, Bokesch HR, mcmahon JB, Ratner DM, et al. The novel fold of scytovirin reveals a new twist for antiviral entry inhibitors. *J Mol Biol.* 2007; 369:451–461.
11. Ziółkowska NE, O'Keefe BR, Mori T, Zhu C, Giomarelli B, Vojdani F, et al. Domain-swapped structure of the potent antiviral protein griffithsin and its mode of carbohydrate binding. *Structure.* 2006; 14:1127–1135.
12. Hsu W-C, Chang S-P, Lin L-C, Li C-L, Richardson CD, Lin C-C, et al. Limonium Sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. *Antiviral Res. Elsevier B.V.* 2015; 118:139–147.
13. Moradpo Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature.* 2010; 465:96–100.
14. Sakunrangsit N, Kalpongnukul N, Pisitkun T, Ketchart W. Plumbagin enhances tamoxifen sensitivity and inhibits tumor invasion in endocrine resistant breast cancer through EMT regulation. *Phyther Res.* 2016.
15. Wang T, Wu F, Jin Z, Zhai Z, Wang Y, Tu B, et al. Plumbagin inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of the nuclear factor-kappa B and mitogen activated protein kinase signaling pathways in RAW 264. 7 cells. *Food Chem Toxicol Elsevier Ltd.* 2014; 64:177–183.
16. Hassan STS, Berchová-Bímová K, Petráš J. Plumbagin, a plant-derived compound, exhibits antifungal combinatory effect with amphotericin B against *Candida Albicans* clinical isolates and anti-hepatitis C virus activity. *Phyther. Res.* 2016; 30:1487–1492.
17. Zhu Y-P, Peng Z-G, Wu Z-Y, li J-R, Huang M-H, Si S-Y, et al. Host APOBEC3G protein inhibits HCV replication through direct binding at NS3. *Villa E. Plos One.* 2015; 10: e0121608.
18. Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1999; 832:97–107.
19. Stevens JF, Taylor AW, Clawson JE, Deinzer ML. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:2421–2428.

20. Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther.* 2002; 1:959–969.
21. Cho Y-C, Kim HJ, Kim Y-J, Lee KY, Choi HJ, Lee I-S, et al. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN-gamma and LPS-activated macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8:567–573.
22. Peluso MR, Miranda CL, Hobbs DJ, Proteau RR, Stevens JF. Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes: structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2) *Planta Med.* 2010; 76:1536–1543.
23. Zhang N, Liu Z, Han Q, Chen J, Lv Y. Xanthohumol enhances antiviral effect of interferon alpha-2b against bovine viral diarrhea virus, a surrogate of hepatitis C virus. *Phytomedicine.* 2010; 17:310–316.
24. Buckwold VE, Wilson RJH, Nalca A, Beer BB, Voss TG, Turpin JA, et al. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antivir Res.* 2004; 61:57–62.
25. Lou S, Zheng Y-M, Liu S-L, Qiu J, Han Q, Li N, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication in vitro by Xanthohumol, a natural product present in hops. *Planta Med.* 2013; 80:171–176.
26. Casaschi A, Maiyoh GK, Rubio BK, Li RW, Adeli K, Theriault AG. The chalcone xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein B secretion in hepg2 cells. *J Nutr.* 2004; 134:1340–1346.
27. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology.* 2008; 47:1437–1445.
28. Chan L-P, Chou T-H, Ding H-Y, Chen P-R, Chiang F-Y, Kuo P-L, et al. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1820:1081–1091.
29. Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol.* 2007; 179:7121–7127.
30. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Structure-activity relations Biochem Pharmacol.* 1984; 33:1525–1530.
31. Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, et al. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in mirna103 transgenic mice. *Sci Rep.* 2013; 3:2553.
32. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science.* 2005; 309:1577–1581.
33. Pfeffer S, Baumert TF. Impact of microRNAs for pathogenesis and treatment of hepatitis C virus infection. *Gastroentérologie Clin Biol.* 2010; 34:431–435.
34. Inoue M, Kurahashi N, Iwasaki M, Shimazu T, Tanaka Y, Mizokami M, et al. Effect of coffee and green tea consumption on the risk of liver cancer: cohort analysis by hepatitis virus infection status. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2009; 18:1746–1753.
35. Costentin CE, Roudot-Thoraval F, Zafrani E-S, Medkour F, Pawlotsky J-M, Mallat A, et al. Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2011;54: 1123–1129.
36. Freedman ND, Everhart JE, Lindsay KL, Ghany MG, Curto TM, Shiffman ML, et al. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009;50: 1360–1369.

37. Batista MN, Carneiro BM, Braga ACS, Rahal P. Caffeine inhibits hepatitis C virus replication in vitro. *Arch Virol.* 2015; 160:399–407.
38. Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem.* 2001; 49:3106–3112.
39. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, et al. The heat shock protein inhibitor quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology.* 2009; 50:1756–1764.
40. Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, Sathiyamoorthy P, et al. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat.* 2012; 19:e81–e88.
41. Pisonero-Vaquero S, García-Mediavilla MV, Jorquera F, Majano PL, Benet M, Jover R, et al. Modulation of PI3K-Ixra-dependent lipogenesis mediated by oxidative/nitrosative stress contributes to inhibition of HCV replication by quercetin. *Lab Investig.* 2014; 94:262–274.
42. Wilcox LJ, Borradaile NM, Huff MW. Antiatherogenic properties of Naringenin, a citrus flavonoid. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006; 17:160–178.
43. Kurowska EM, Borradaile NM, Spence JD, Carroll KK. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutr Res.* 2000; 20:121–129.
44. Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, et al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:1095–1100.
45. Goldwasser J, Cohen PY, Lin W, Kitsberg D, Balaguer P, Polyak SJ, et al. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J. Hepatol. European Association for the Study of the Liver.* 2011; 55:963–971.
46. Goldwasser J, Cohen PY, Lin W, Kitsberg D, Balaguer P, Polyak SJ, et al. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J. Hepatol. European Association for the Study of the Liver.* 2011; 55:963–971.
47. Spann NJ, Kang S, Li AC, Chen AZ, Newberry EP, Davidson NO, et al. Coordinate transcriptional repression of liver fatty acid-binding protein and microsomal triglyceride transfer protein blocks hepatic very low density lipoprotein secretion without hepatosteatosis. *J Biol Chem.* 2006; 281:33066–33077.
48. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, et al. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology.* 2010; 51:1912–1921.
49. Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, Pal S, Lee DYW, Liu Y, et al. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:5995–5999.
50. Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. Blaising J, Lèvy PL, Gondeau C, Phelip C, Varbanov M, Teissier E, Ruggiero F, Polyak SJ, Oberlies NH, Ivanovic T, Boulant S, Pécheur EI. *Cell Microb.* 2013; 11: 1866–1882
51. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 369:87–112.
52. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2006; 80:6964–6972.

53. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2010 Jan;51(1):201-9.